

DUILIO TEIXERA SOARES JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA POMADA OBTIDA DO EXTRATO
HEXÂNICO DE FOLHAS DE *VANILLOSMOPSIS ERYTHROPAPPA* SCHULTZ –
BIP**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Marisa Alves nogueira Diaz
Coorientadora: Virgínia Ramos Pizzolo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S676a
2019
Soares Júnior, Duilio Teixeira, 1982-
Avaliação do efeito cicatrizante da pomada obtida do
extrato hexânico de folhas de *Vanillosmopsis erythropappa*
Schultz - Bip / Duilio Teixeira Soares Júnior. – Viçosa, MG,
2019.

104 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 85-102.

1. Cicatrização. 2. Colágeno tipo I. 3. Colágeno tipo III.
4. Neovascularização. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 615.5

DUILIO TEIXERA SOARES JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA POMADA OBTIDA DO EXTRATO
HEXÂNICO DE FOLHAS DE *VANILLOSMOPSIS ERYTHROPAPPA* SCHULTZ –
BIP**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de agosto de 2019.

Duílio Teixeira Soares Júnior
(Autor)

Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir” (Steve Jobs)

Início agradecendo a Deus. Ele esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada. Aos meus pais, por me terem dado educação e valores, meu respeito é eterno. A meu pai (*in memoriam*), que onde quer que esteja nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. Pai, meu amor a você. À minha mãe, pelo amor incondicional, meu exemplo de luta e resiliência, muitas vezes vocês renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. Partilho a alegria deste momento.

Agradeço à minha amada esposa, amiga e companheira de jornada da vida, Juliana, pelo apoio, suporte e amor dedicado a toda a família durante esses anos.

Aos meus pequeninos filhos Pietra e Duilio Neto, minha nova luz. Amo vocês incondicionalmente, vocês estão em meus pensamentos e coração em todos os momentos.

Obrigado a todos os meus familiares e aos meus amigos, em particular aos meus irmãos e sobrinhos.

Meu muito obrigado à minha orientadora e Professora Doutora Marisa Alves Nogueira Diaz e Coorientadora Virgínia Ramos Pizzolo, pela confiança depositada. Ainda no âmbito acadêmico agradeço a todos os colegas de curso que se dedicaram e contribuíram nos vários momentos de pesquisa e confecção do trabalho.

Aos amigos do **Laboratório de Performance Humana (LAPEH)**, pelo apoio.

À **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** por intermédio do **Departamento de Bioquímica**, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao programa de **Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada**, pela oportunidade de cursar o doutorado;

Ao FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro;

À **Divisão de Saúde**, pelo apoio de todos os servidores, em especial aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas.

À **UNIVIÇOSA**, em especial aos colegas professores farmacêuticos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada família: meus amados filhos, Duilio Neto e Pietra, minha esposa Juliana, minhas irmãs Danusa e Daniela, meus sobrinhos, e aos meus queridos pais, Mônica e Duilio.

“Todo saber e todo aumento de saber, em vez de terminar em uma solução, dá antes início a nova dúvida. Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas. E a cada resposta, nova pergunta se segue.”

(Hermann Hesse)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Vanillosmopsis erythropappa</i> Schultz – Bip.	16
Figura 2 – Etapas do processo angiogênico.	25
Figura 3 – Exsicata das folhas de <i>V. erythropappa</i> Schultz – Bip.	35
Figura 4 – Identificação da exsicata no herbário da UFV.	36
Figura 5 – Rato Wistar anestesiado com lesão realizada cirurgicamente no dorso. .	40
Figura 6 – Determinação da área da ferida por medição. A1: área horizontal; A2: área vertical. (Ângulo de 90 graus).	42
Figura 7 – Porcentagem de viabilidade celular em extrato hexânico.	48
Figura 8 – Porcentagem de vida celular em extrato etanólico (toxicidade do etanol).	48
Figura 9 – Ação do extrato hexânico em relação ao controle	49
Figura 10 – Ação do extrato etanólico em relação ao controle.....	49
Figura 11 – Estímulo de crescimento.	50
Figura 12 – Cromatograma do extrato hexânico das folhas de <i>V. erythropappa</i> Schultz – Bip obtido pela análise de CG-EM. Picos numerados de 1 a 9: 1) α -cariofileno; 2) 2-metil-hexacosano; 3) Tetracontano; 4) Lupenona; 5) Acetato de Lupeol; 6) α -amirina; 7) Lupeol; 8) Friedelan-3-one; 9) Acetato de Lupanol, correspondem aos compostos de maiores intensidades no extrato.....	54
Figura 13 – Estrutura do Lupeol e seus derivados.	55
Figura 14 – Estrutura do α -cariofileno, α -amirina e da friedelina ou friedelan-3-one.	56
Figura 15 – Apigenina.	60
Figura 16 – Luteolina.....	61

Figura 17 – Estrutura dos flavonóides Apigenina e Luteolina.	62
Figura 18 – Representação fotográfica da evolução macroscópica das feridas controles e experimental. Grupos tratados com a pomada contendo 1% (G1), 3% (G2) e 5% (G3) do extrato de <i>V. erythropappa</i> Schultz – Bip, com a pomada veículo (G4) e com pomada Fitoscar® (G5), nos dias zero, 07, 14 e 21 de pós operatório.	64
Figura 19 – Análise do teor de Creatinina (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.	68
Figura 20 – Análise do teor de Ureia (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.	68
Figura 21 – Análise do teor de Leucócitos Globais (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.	69
Figura 22 – Análise do teor de TGO (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.	69
Figura 23 – Análise do teor de TGP (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.	69
Figura 24 – Análise do teor de Ácido Úrico (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.	70
Figura 25 – Expressão imunoistoquímica do VEGF nas células teciduais de feridas tratadas com pomadas contendo o extrato de <i>V. erythropappa</i> Schultz – Bip nas concentrações 1% (G1), 3% (G2) e 5% (G3), com a pomada veículo (G4) e com a pomada Fitoscar® (G5). * Apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05\%$) quando comparados com o grupo controle positivo (pomada veículo) e controle negativo (pomada Fitoscar®).	72

Figura 26 – Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com coloração Picrosirius e aumento de 400x, que mostra a distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) no tecido cicatricial da pele de ratos tratados com pomadas contendo extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip nas concentrações 1% (G1), 3% (G2), 5% (G3), pomada veículo (G4) e Pomada Fitoscar® (G5) nos dias sete, quatorze e vinte e um de pós operatório.74

Figura 27 – Percentual de colágeno tipo III (verde) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no sétimo dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).78

Figura 28 – Percentual de colágeno tipo III (verde) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no décimo quarto dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).78

Figura 29 – Percentual de colágeno tipo III (verde) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no vigésimo primeiro dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).79

Figura 30 – Percentual de colágeno tipo I (vermelho) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no sétimo dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).79

Figura 31 – Percentual de colágeno tipo I (vermelho) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no décimo quarto dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).....80

Figura 32 – Percentual de colágeno tipo I (vermelho) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no vigésimo primeiro dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos experimentais por grupo de animais, sendo 18 animais por grupo.....	41
Tabela 2 – Porcentagem de vida celular em função da concentração do extrato Hexânico.....	47
Tabela 3 – Porcentagem de vida celular em função da concentração do extrato Etanólico.....	47
Tabela 4 – Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das feridas dos grupos tratados com a pomada contendo 1% (G1), 3% (G2) e 5% (G3) do extrato de <i>V. erythropappa</i> Schultz – Bip, com a pomada veículo (G4) e com pomada Fitoscar® (G5), nos dias 07, 14 e 21 de pós operatório.....	65
Tabela 5 – Quantitativo de colágeno tipo III (verde) nas feridas tratadas com as pomadas nos dias sete, quatorze e vinte um de pós-operatório	76
Tabela 6 – Quantitativo de colágeno tipo I (vermelho) nas feridas tratadas com as pomadas nos dias sete, quatorze e vinte um de pós-operatório.....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Feridas.....	18
2.2 Cicatrização	20
2.2.1 Fase inflamatória	21
2.2.2 Fase Proliferativa	21
2.2.3 Fase de maturação	22
2.2.4 Angiogênese	24
2.3 Fatores que influenciam na cicatrização.....	25
2.4 Tratamento de feridas	27
2.5 Plantas medicinais.....	27
2.6 <i>Vanillosmopsis erythropappa</i> Schult - Bip (“Candeia- da- Serra”).....	29
2.7 Atividade antibacteriana e cicatrizante da Candeia-da-Serra.....	31
2.8 Cultivo e Manejo da Candeia da Serra	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material Botânico	35
4.2 Preparação do Extrato	36
4.3 Preparação da Pomada.....	36
4.4 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/MS)	36
4.5 Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC/MS)	37
4.6 Avaliação da Proliferação Celular <i>in vitro</i> em Culturas Celulares de Fibroblastos Humanos.....	38
4.8 Avaliação da Proliferação Celular <i>in vivo</i>	39
4.9 Procedimento Cirúrgico	39
4.10 Organização dos Grupos Experimentais e Tratamento Tópico das Lesões.....	40
4.11 Análises Macroscópicas das Feridas	41
4.12 Análises Quantitativa do Colágeno.....	43
4.13 Imunoensaio para VEGF	43
4.14 Eutanásia	45

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.2 Análise da Proliferação Celular <i>In Vitro</i> em Culturas Celulares de Fibroblastos Humanos.....	47
6.3 Análise do Extrato ativo por Cromatografia Gasosa - espectroscopia de massa (CG/MS).....	51
6.4 Análise do Extrato ativo por Cromatografia Líquida (Método LC/MS)	57
6.5 Análises dos Resultados de Feridas Tratadas com Extrato de <i>V. erythropappa</i> Schultz – Bip.....	63
6.5.1 Avaliação Clínica dos Animais e Feridas	63
6.5.2 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e Imunológicos	67
6.5.3 Avaliação da Imunoensaio para VEGF	71
6.5.4 Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Colágeno tipo I e tipo III	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO.....	103

RESUMO

JÚNIOR, Duílio Teixeira Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto, 2019. **Avaliação do efeito cicatrizante da pomada obtida do extrato hexânico de folhas de *vanillosmopsis erythropappa schultz – bip*** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientador: Virgínia Ramos Pizziolo

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial cicatrizante das folhas de do extrato hexânico das folhas de *Vanillosmopsis erythropappa schultz – bip*. e identificar os principais constituintes por CG/EM. Os extratos das folhas *Vanillosmopsis erythropappa schultz – bip* de foram testados frente teste de estimulação da proliferação celular *in vitro*, sendo que o extrato em hexânico apresentou resultado mais significativo comparado ao extrato etanólico. Pela análise do extrato ativo cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (CG/EM) foi detectado a presença de compostos importantes para o processo de cicatrização celular, como Lupenona; Lupeol e Friedelan-3-one. A expressão do VEGF nos cinco grupos estudados e verificou que aqueles tratados com a pomada contendo o extrato de *V. erythropappa Schultz – Bip* apresentaram expressão aumentada em grupos tratados com as pomadas nas concentrações 1% e 3%, acelerando assim o processo de cicatrização. Pela análise do extrato ativo por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CG – MS) permitiu detectar a presença de dois flavonóides: Apigenina e Luteolina importantes no processo de síntese de colágeno tipo I e III. Ao final do tratamento os grupos controle (G4) e Fitoscar® (G5) tiveram maior quantidade de fibras do tipo III, consideradas imaturas, e os grupos tratados com as pomadas contendo extrato 1% e 5% (G1 e G3, respectivamente) tiveram maior quantidade de fibras do tipo I, consideradas maduras, indicando que tais formulações foram efetivas para a cicatrização das feridas, com G3 apresentando o melhor resultado.

ABSTRACT

JÚNIOR, Duilio Teixeira Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august 2019. **Evaluation of the healing effect of ointment obtained from hexane leaf extract of *vanillosmopsis erythropappa schultz – bip***. Advisor: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co - Advisor: Virginia Ramos Pizziolo.

The objective of this study was to evaluate the healing potential of the leaves of the hexane extract of *Vanillosmopsis erythropappa schultz - bip* leaves and identify the main constituents by GC/MS. *Vanillosmopsis erythropappa schultz - bip* de leaf extracts were tested against in vitro cell proliferation stimulation test. By the analysis of the active extract gas chromatography-mass spectroscopy (GC/MS) was detected the presence of important compounds for the cell healing process, such as Lupenone; Lupeol and Friedelan-3-one. The expression of VEGF in the five groups studied and found that those treated with ointment containing *V. erythropappa Schultz - Bip* extract showed increased expression in groups treated with ointments at concentrations 1% and 3%, thus accelerating the healing process. By the analysis of the active extract by mass spectrometer - coupled liquid chromatography (GC/MS) it was possible to detect the presence of two important flavonoids: Apigenin and Luteoline in the collagen synthesis process type I and III. At the end of treatment, the control groups (G4) and Fitoscar® (G5) had the highest amount of type III fibers, considered immature, and the groups treated with ointments containing 1% and 5% extract (G1 and G3, respectively) higher amount of type I fibers, considered mature, indicating that such formulations were effective for wound healing, with G3 presenting the best result.

1. INTRODUÇÃO

Os avanços na medicina e na ciência fez surgir inúmeras opções de medicamentos sintéticos para tratamento das mais diversas enfermidades. Contudo, muitos desses fármacos passaram a provocar efeitos colaterais indesejáveis, além de apresentarem alto valor de compra, o que fez com que a prática milenar, presente desde os primórdios da humanidade e baseada no conhecimento passado por gerações, de tratar e curar enfermidades por meio de plantas medicinais, fosse resgatada (MACIEL *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004; BRASIL, 2010).

Com isso, ressurgiu o interesse por fitoterápicos e aumentou o consumo de produtos naturais seguros e efetivos, o que tornou necessário o constante estudo sobre óleos e extratos vegetais que atendessem a esses propósitos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2012). Já se sabe que os óleos essenciais e os extratos vegetais apresentam compostos com importantes características terapêuticas, dentre as principais, tem-se: antimicrobianas, analgésicas, anti-inflamatórias, vermífugas, antissépticas, antiespasmódicas e cicatrizantes (LIMA *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2013).

Os extratos vegetais são compostos de substâncias bioativas que variam de acordo com a polaridade do solvente utilizado para sua extração, e que apresentam baixo peso molecular e estrutura complexa, o que facilita sua absorção e metabolização, características importantes para uma nova droga (FABRI *et al.*, 2011). Nesse contexto, o metabolismo secundário das plantas resulta em substâncias químicas de composição complexa, que ao serem extraídas dos vegetais podem formar os extratos bioativos ou os óleos essenciais compostos de terpenos e fenilpropanóides (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais, por sua vez, apresentam elementos voláteis que são encontrados nos órgãos vegetais como folhas, raízes, caules, sementes e flores, e que atuam na defesa contra microrganismos, sendo, portanto, fundamentais na sobrevivência do vegetal (SIQUI *et al.*, 2000). Cientificamente já se tem comprovado que, das propriedades dos óleos essenciais, em média, 60% deles apresentam potenciais antifúngicos e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOU, 1992).

Diante do cenário de plantas medicinais, sabe-se que o território brasileiro é composto por florestas nativas que apresentam grande diversidade de espécies, e dentre elas está a *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz – Bip (figura 1), pertencente à família Asteraceae, que é popularmente conhecida como “candeia-da-serra”. Em Minas Gerais, essa espécie é encontrada principalmente no alto das Serras da Mantiqueira e do Espinhaço e partes altas da zona da mata mineira. O mais importante constituinte ativo presente nas folhas de tal espécie vegetal é o α -bisabolol, que em estudos demonstrou apresentar propriedades antiflogística, antibacteriana, antimicótica e dermatológica. Popularmente, a candeia é utilizada como cicatrizante, no combate às infecções e no tratamento de úlceras pépticas, principalmente por meio de preparações a partir das folhas da espécie vegetal (SILVÉRIO *et al.*, 2008).



Figura 1 – *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz – Bip.

As feridas, que podem ser agudas traumáticas ou cirúrgicas, evoluem no processo cicatricial de maneira e em tempos previsíveis a partir do momento da injúria até o seu fechamento (TRINDADE *et al.*, 2010). Assim, se faz necessário um tratamento correto para evitar complicações e atraso na cicatrização. Com isso, a busca de novos constituintes que possuam poder de cicatrização é de suma importância para o tratamento de feridas que podem ser agravadas com a presença de bactérias nesses locais, uma vez que esses microrganismos têm apresentado considerável resistência aos antibióticos (BERTINI *et al.*, 2005).

Em virtude da complexidade do tratamento e do processo cicatricial, os quais podem evoluir para complicações recorrentes e geram elevados custos, as feridas são consideradas um importante problema de saúde humana e animal, o que tem levado à necessidade de estudos inovadores que visem potencializar o efeito do tratamento e reduzir os custos do mesmo (BRODERICK, 2009; PONNUSAMY *et al.*, 2015).

Além disso, estudos voltados para a compreensão dos mecanismos de resistência dos microrganismos e para o desenvolvimento de novas drogas, principalmente as naturais, devem ser realizados, uma vez que a resistência microbiana tem aumentado e o uso de antibióticos precisa ser controlado (PRASHAR *et al.*, 2003).

Nesse sentido, tem sido avaliado, em especial nas últimas décadas, o potencial de plantas serem fonte de produtos naturais capazes de trazer benefícios à saúde, ocorrendo assim intensos estudos visando a terapia natural. Assim, visando melhores resultados nos mais diversos tratamentos de saúde, o uso de plantas no ramo farmacêutico tem crescido gradualmente no Brasil. Com isso, os estudos têm mostrado que extratos ou óleos essenciais apresentam importante atividade antibacteriana dependendo do tipo, composição e concentração deste, variando também de acordo com a composição do substrato, as condições de processamento e estocagem, e o tipo de microrganismos envolvido (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; BERTINI *et al.*, 2005).

Diante do exposto, ressalta-se a relevância de estudos que busquem explorar o potencial terapêutico cicatrizante de compostos obtidos a partir de plantas que possam, assim, otimizar o processo de cicatrização de feridas e reduzir os custos do tratamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Feridas

Defina-se ferida como a ruptura do sistema tegumentar, na qual sua estrutura e funções são alteradas, afetando o processo de cicatrização. Resulta de um conjunto de eventos que vão do trauma, causado por agentes mecânicos, químicos, biológicos ou térmicos, ao fechamento total, envolvendo processos bioquímicos e fisiológicos complexos que atuam em harmonia para garantir a reconstrução completa do tecido. São classificadas de acordo com a sua causa, presença de microrganismo, tamanho da abertura, tempo de duração e forma como se dá sua cicatrização, de maneira que conhecer essas classificações é necessário para estabelecer o melhor tratamento (PAVLETIC, 2010; COLTRO *et al.*, 2011).

Mensurar as feridas é importante para que seja feito um diagnóstico adequado, estabelecendo o tratamento correto e avaliando seu resultado sobre o processo cicatricial. Assim, os principais tipos de feridas são as cirúrgicas, traumáticas e as ulcerativas. As feridas cirúrgicas, aquelas decorrentes de quadro infeccioso ou isquêmico após cirurgia prévia, ocorrem por incisão, não havendo perda de tecido e capazes de terem suas bordas fechadas por sutura; excisão, havendo remoção de parte do tecido; e punção, resultantes de métodos terapêuticos para diagnósticos, como biópsias, por exemplo (FERREIRA *et al.*, 2006; EBERHARDT, 2015).

As feridas traumáticas são aquelas em que alguns agentes atuam, de maneira acidental, a saber: agentes químicos, como ácidos; agentes físicos, como radiação; e agentes mecânicos, como cortes. Incluem também as queimaduras amplas e mais profundas, que resultam em exposição de tecido. Estas podem evoluir de forma mais grave, para lacerações, descolamento de pele e até mesmo amputações, ocorrendo comprometimento da função e perda do tecido (COLTRO *et al.*, 2011).

Por fim, as do tipo ulcerativas são aquelas causadas por doenças que provocam baixo suprimento sanguíneo do tecido, ou por decúbito prolongado, tendo assim as úlceras diabéticas, por estase venosa e arterial ou por pressão. De maneira geral, evoluem para necrose do tecido, sendo ainda mais agravante em paciente com sistema imune debilitado (SANTOS, 2011).

Com relação ao grau de contaminação, as feridas podem ser limpas, limpas contaminadas, contaminadas ou infectadas, variando de acordo com a sua causa, tempo de ocorrência e evolução. As feridas limpas são aquelas realizadas em cirurgias eletivas de forma asséptica, sem conteúdo microbiano ou presença de inflamação. As limpas contaminadas são aquelas em que a presença de microrganismos não é significativa e que é tratada em até seis horas após sua ocorrência. As contaminadas são aquelas em que o tratamento ocorre com mais de seis horas após o trauma, mas que ainda não apresenta inflamação. Já as infectadas apresentam significativa conteúdo microbiano, com nítido processo inflamatório, presença de secreção purulenta e que pode evoluir para necrose tecidual (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; SANTOS, 2011).

Com relação à cicatrização, as feridas podem ser classificadas quanto ao tipo e o tempo de existência. Quanto ao tipo, podem ser de primeira intenção, geralmente provocadas por sutura cirúrgica, na qual as bordas se aproximam diretamente, sem comprometimento do tecido ou presença de infecção; de segunda intenção, na qual o fechamento é mais lento, ocorrendo perda tecidual intensa, geralmente devido à presença de infecção; e de terceira intenção, aquela que ocorre após tratar a infecção, sendo corrigida por cirurgia (ETHRIDGE; LEONG; PHILLIPS, 2010).

Quanto ao tempo de cicatrização, podem ser agudas, as quais são reparadas no tempo adequado e sem complicações; e as crônicas, que persistem por mais de seis meses, resistindo ao tratamento, evoluindo com complicações, e que geralmente tem base em uma doença prévia, como o diabetes, por exemplo. Atualmente, as feridas crônicas são consideradas um problema de saúde pública no Brasil, uma vez que o número de pacientes com esse tipo de ferida é elevado, ocasionando altos custos com tratamento e previdências (ROCHA; CARNEIRO; SOUZA, 2014).

Com a instalação da ferida, eventos específicos são desencadeados como forma de resposta do organismo, entre eles, tem-se a produção de endotelina pela contração do músculo liso endotelial para conter a hemorragia, e ativação das plaquetas para formar coágulo na matriz, que auxiliam na cicatrização e hemostasia. Após o rompimento do tecido pela lesão, o ambiente se torna propício a esses eventos, uma vez que o sangramento e o extravasamento proteico vascular estimulam tais eventos (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

2.2 Cicatrização

A cicatrização do tecido lesionado ocorre pela ação de células e moléculas em eventos coordenados que envolvem processos bioquímicos e fisiológicos voltados para a restauração tecidual (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Essa restauração pode ocorrer por meio da regeneração e da reparação, contudo, a regeneração nos seres humanos ocorre apenas no período embrionário ou em tecido ósseo e hepático, ficando disponível a reparação para o fechamento de uma ferida, sendo um processo mais complexo que envolve fibroblastos, fatores de crescimento e células inflamatórias (TENIUS; BIONDO-SIMÕES; IOSHII, 2007; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Alguns fatores específicos, intrínsecos ou extrínsecos, podem influenciar a sequência dos eventos envolvidos na cicatrização, a saber: presença de microrganismos e/ou de corpo estranho, desenvolvimento de processo infeccioso, presença de tecido isquêmico e ocorrência de edema. Além disso, o tipo de procedimento cirúrgico também pode influir nesse evento (SZWED; SANTOS, 2015).

Dos processos envolvidos na cicatrização, tem-se a inflamação, a reepitelização, a angiogênese, a formação de tecido de granulação e a deposição de matriz intersticial. Convencionou-se, no entanto, para facilitar o entendimento, classificar o processo cicatricial em fases específicas sucessivas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (ou fase de remodelagem) (PAVLETIC, 2010). Essas fases envolvem processos que se estabelecem de maneira contínuas, mas que se interligam, de maneira que um mesmo fármaco pode acelerar uma fase, mas interromper outra (FAHIE; SHETTKO, 2007).

Nesse sentido, compreender os mecanismos envolvidos no processo de cicatrização é importante para definir a melhor proposta terapêutica e para estabelecer a melhor conduta em uma cirurgia, por exemplo, de maneira a prevenir complicações e promover condições favoráveis à reparação do tecido. Quanto a isso, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para identificar fármacos capazes de acelerar esse processo (BEHEREGARAY *et al.*, 2014).

2.2.1 Fase inflamatória

É a primeira fase, que se inicia de forma imediata após a lesão e que pode durar até cinco dias. Nessa fase, substâncias que causam a vasoconstrição são liberadas nas membranas das células, e as plaquetas iniciam a cascata de coagulação (PAVLETIC, 2010). Ocorre hemostasia por meio da vitamina K, que sintetiza a protrombina, e assim, a perda sanguínea decorrente do vaso lesionado é diminuída, e forma-se então uma rede, para onde os fibroblastos migrarão. Tem-se também a fagocitose de bactérias pelos neutrófilos, a fim de evitar um processo infeccioso, e a ação de macrófagos no debridamento completo, que eliminam coágulos, bactérias e tecido necrosado, para que o ambiente esteja favorável à ação de células de reparação tecidual, e secretam fatores de crescimento; fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial (VEGF) e citocinas que auxiliam na angiogênese e fibroplasia. Em seguida as células epiteliais migram-se para o leito da ferida, das margens para o centro e apenas em tecido viável, para iniciar o fechamento da lesão (BOTTONI et al., 2011; SZWED; SANTOS, 2015).

Após se formar trombos plaquetários para o tamponamento dos vasos lesionados, o fluxo sanguíneo local irá aumentar em virtude da secreção de mediadores bioquímicos, como a histamina e serotonina, de ação reduzida, e as bradicininas e prostaglandinas, de ação prolongada, levando assim ao desenvolvimento dos primeiros sinais de inflamação – calor, rubor, dor e edema – para assim estabelecer o começo da fase inflamatória, que basicamente consiste em promover coagulação, debridamento do tecido e eliminação do conteúdo microbiano (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; PAVLETIC, 2010).

2.2.2 Fase Proliferativa

Fase que ocorre entre o quinto e o vigésimo dia pós lesão e que compreende quatro etapas, a saber: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e disposição de colágeno, as quais em sequência, levarão ao fechamento da ferida (PAVLETIC, 2010). A epitelização, consiste em um processo precoce mas que só se evidencia após alguns dias, promovendo restauração da barreira para evitar extravasamento de líquido e proliferação de microrganismos.

Nessa etapa as células do epitélio promovem migração de queratinócitos em movimento paralelo às fibras colágenas, por meio de quebra da fibrina. Ocorre a reestruturação das funções do tecido que foram prejudicadas em virtude da lesão, como a proteção mecânica, a regulação térmica, a barreira hídrica e a proteção contra infecção microbiana (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

A próxima etapa, chamada de proliferação, ocorre em até dois dias após a lesão mas só fica evidente após o quarto dia, promovendo migração das células do endotélio e formação de capilares, os quais são necessários para que a cicatrização ocorra de maneira eficaz (PAVLETIC, 2010). Na seção adiante (2.2.4) os mecanismos envolvidos nessa etapa estão apresentados mais detalhadamente.

A última etapa, chamada de formação de tecido de granulação, ocorre a formação desse tecido que é composto de matriz extracelular, colágenos, fibroblastos, queratinócitos e novos capilares. Os principais envolvidos nessa etapa são as células do endotélio e os fibroblastos, os quais são ativados pelos fatores de crescimento e estimulados a produzirem colágeno, responsável pela contração da ferida (HENDLUND, 2007).

2.2.3 Fase de maturação

A fase de maturação corresponde a última das fases da cicatrização, tendo início após cerca de 14 dias, sendo possível se manter por meses. Nesta fase, ocorre diminuição gradativa da vascularização e dos fibroblastos, assim como ocorre o aumento da força de tensão e a reorganização das fibras colágenas pela enzima colagenase. A fase de maturação é dividida em duas etapas: a contração e a remodelagem (PEERSCHEKE; YIN; GHEBREHIWET 2008).

No processo da contração da ferida, a pele periférica avança em direção ao centro da lesão (PAVLETIC, 2010). Para que este processo aconteça, são necessárias a presença de quantidade significativa de fibroblastos e a interação complexa de células, da matriz extracelular e mediadores, como TGF- β 1, TGF- β 2 - Fator de transformação do crescimento beta - e PDGF - Efeito do fator de crescimento derivado de plaquetas. Presentes na ferida, os fibroblastos, também denominados de miofibroblastos, desenvolvem propriedades da musculatura lisa, como proteínas contráteis, ao longo da face citoplasmática da membrana basal (HOSGOOD, 2006).

Reforça-se que a contração da ferida é induzida quando as células epiteliais migram sobre a área da lesão; dos folículos pilosos que se encontram mais próximos e pela formação de novas células nessa área. É importante abordar tal questão uma vez que essa contração pode ser prejudicada pela utilização de anti-inflamatórios, drogas anti-microtubulares e pelo uso de relaxantes musculares, com aplicação local, que atuam na musculatura lisa (HOSGOOD, 2006; HENDLUND, 2007).

Além do processo de contração, outro processo que a fase de maturação aborda é o da remodelagem. Nele, a cicatriz envolve etapas contínuas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. Sobre este último, colágeno tipo III encontra-se em maior quantidade que o tipo I. Entretanto, com o decorrer do tempo, o tipo III passa a ser mais degradado. Enquanto isso, o colágeno tipo I tem sua produção aumentada pelos fibroblastos (SINGER; CLARK, 1999).

Ao passo em que o processo de maturação da ferida se desenvolve, ocorre a diferenciação das células endoteliais dos vasos recém-formados em células de revestimento. Com isso, esses vasos passam a atribuir características funcionais de vasos capilares. As células que possuem transformações fenotípicas mais acentuadas são os fibroblastos (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

No início do processo, se caracterizam por células imaturas migratórias e replicativas. Após, seu citoplasma se tornar volumoso e apresentar bastante retículo endoplasmático rugoso, se tornam células destinadas à síntese proteica. Sendo assim, começam a secretar grandes quantidades de colágeno, substituindo, gradativamente, os proteoglicanos e a fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

O colágeno se encontra diretamente responsável pela força de tensão da ferida em cicatrização. Nesse sentido, a ferida passa a se tornar mais madura conforme as fibras colágenas tipo I estiverem em maior concentração. Assim como, haverá maior proliferação de fibroblasto quando a deposição de colágeno for maior. Tal processo é controlado pela enzima collagenase, produzida por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos na ferida (PAVLETIC, 2010). Portanto, por meio de processos de migração ou apoptose, com a realização do processo de maturação, grande parte dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparece do local onde se encontra a ferida (ARNOLD & WEST, 1991).

Desse modo, ocorre redução na dimensão da cicatriz e mudança gradual da coloração da ferida. A alteração da coloração é um indicativo do processo de cicatrização, em que a ferida passa do vermelho a um róseo pálido. Ao término desta etapa, ocorre regeneração limitada nos anexos de pele, como folículos pilosos e glândulas. Como a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipovascularizadas, a coloração da cicatriz permanece pálida, em virtude do desaparecimento dos neocapilares (JOHNSTON, 1990).

2.2.4 Angiogênese

Com a ocorrência da lesão vascular causada pela ferida, entre um ou dois dias, inicia-se o processo de reparação via angiogênese, no qual há formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, consistindo em etapa primordial na cicatrização. Inicia-se com a liberação da enzima colagenase pelas células do endotélio capilar, a qual irá degradar o colágeno da membrana basal, permitindo que células do endotélio migrem para o espaço perivascular da ferida, formando ramificações no tecido de granulação (RAJA *et al.*, 2007; SCHUGART *et al.*, 2008).

Ocorre fisiologicamente no processo cicatricial e de reparação do tecido por eventos bioquímicos e morfológicos subsequentes, mediados por fatores de crescimento, em especial o VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular – uma citocina que promove vasodilatação através da produção de óxido nítrico (NO) e aumenta a permeabilidade vascular. Essa maior permeabilidade induz o extravasamento de proteínas que formarão uma rede de fibrina no tecido (ZHANG *et al.*, 2011).

Após a migração de células endoteliais decorrente da degradação da membrana basal, os fatores de crescimento estimulam a proliferação celular e ao final do processo ocorre maturação das células deste novo vaso, seguido de estabilização do mesmo com presença de células mesenquimais, diferenciação celular e regeneração da matriz extracelular e da membrana basal (LIEKENS *et al.*, 2001; JAIN, 2003).

A figura 2 retrata as fases do processo angiogênico, na qual se vê: em (A) a ativação de células endoteliais, (B) a secreção de proteases que irão degradar a membrana basal e a matriz extracelular, (C) a formação do broto capilar após migração das células, (D) o crescimento do vaso; (E) a formação do lúmen e da nova membrana basal; (F) a união de dois brotos para formar a alça capilar e (G) a formação da segunda geração de brotos capilares.

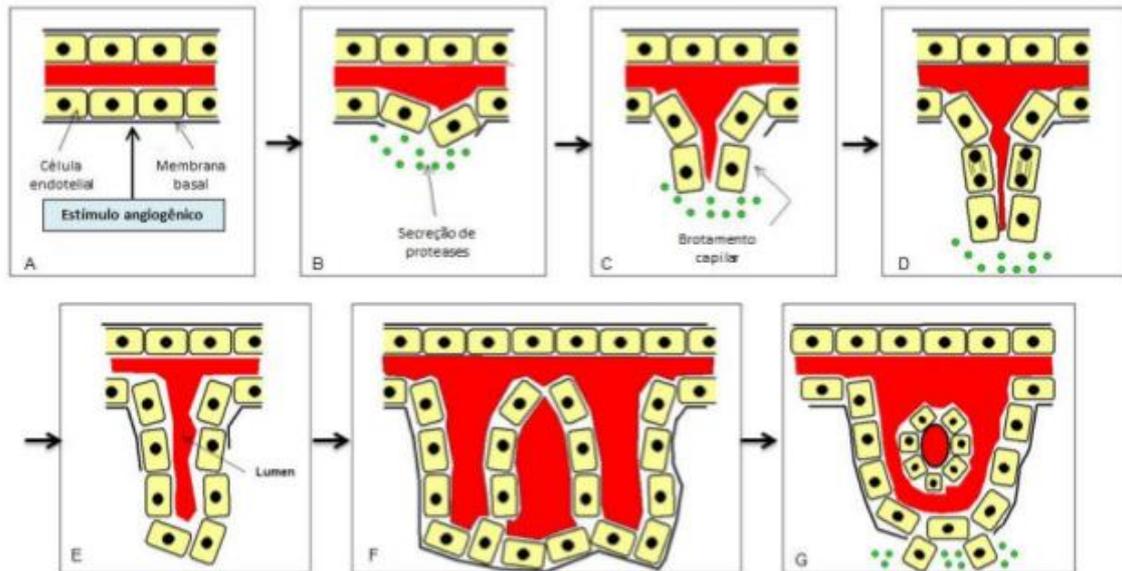


Figura 2 – Etapas do processo angiogênico.
Fonte: GRIZZI *et al.*, 2005 apud CASTRO, 2012.

2.3 Fatores que influenciam na cicatrização

São diversos os fatores que interferem na cicatrização. Dentre os principais, se encontram o estado nutricional do indivíduo; sua faixa etária; o fato de possuírem doenças como alterações cardiovasculares, alterações no processo de coagulação, infecção sistêmica e diabetes; e o uso de medicamentos sistêmicos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; CANDIDO, 2006).

Diante disso, sabe-se que o estado nutricional é de suma importância para a cicatrização. Isso porque, por meio da manutenção da estabilidade nos níveis de carboidratos, proteínas, vitaminas, lipídios e sais minerais, o processo de cicatrização pode ser realizado. Diferentemente daqueles que se encontram desnutridos, os quais apresentam dificuldade na cicatrização. Dependendo do estado nutricional, pode-se desencadear a redução da síntese de colágeno e resposta imunológica (DEALEY, 2001).

Outro aspecto é a faixa etária. Conforme esta vai avançando no indivíduo, ocorre a redução do número dos vasos, as glândulas sudoríparas passam a atrofiar e há a queda da resposta imunológica em virtude da redução de anticorpos. Conseqüentemente, a musculatura se torna mais flácida, também (CANDIDO, 2006).

É importante ressaltar que o funcionamento das células está diretamente ligado a presença da glicose. Isto porque é por meio desta que os fibroblastos e leucócitos retiram sua principal fonte de energia. Dessa maneira, a falta da mesma gera prejuízo no desempenho destas células (PAVLETIC, 2010). A fibroplasia se encontra diretamente relacionada às proteínas plasmáticas. Estas estão ligadas a realização da resposta imunológica, proliferação de fibroblastos, angiogênese, fagocitose, síntese de colágeno e remodelagem da ferida. Com isso, havendo níveis reduzidos de proteínas plasmáticas, há redução da fibroplasia (SLATTER, 2007).

Assim como os fatores citados acima, outro que interfere na cicatrização é o diabetes. Alguns aspectos, como a redução ou deficiência na produção de níveis de crescimento na resposta angiogênica, na função e quantidades de macrófagos, na barreira epidérmica, na quantidade de tecidos de granulação, na acumulação de colágeno, na migração de queratinócitos e na proliferação de fibroblastos, colaboram para que a cura de feridas em diabéticos seja mais dificultosa quando comparada a uma pessoa que não possui a doença (BREM; TOMIC-CANIC, 2007).

O processo de cicatrização também pode ser influenciado pelo uso de medicamentos, sobretudo aqueles que retardam a coagulação sanguínea, como a aspirina e os corticosteroides (HENDLUND, 2007). No caso de indivíduos que fazem tratamento de quimioterapia, o processo de cicatrização costuma ser mais lento, isso porque ocorre uma pausa no ciclo celular. Além disso, há interferência no metabolismo de sais minerais e vitaminas que são importantes para o processo por conta dos agentes quimioterápicos. Os indivíduos imunodeprimidos estão mais propensos a infecção e a dificuldade na cicatrização, visto que não conseguem produzir uma resposta inflamatória efetiva. (HANKS; SPODNICK, 2005).

2.4 Tratamento de feridas

A remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos no leito da ferida; a eliminação dos de fatores que possam levar a infecção; a absorção do excesso de exsudato; manter úmido o leito da ferida; promover o isolamento térmico e proteger a ferida de contaminação bacteriana e traumas são princípios que direcionam a terapia tópica de feridas. Esta é baseada em estudos científicos sobre a fisiologia de reparação tecidual (BLANES, 2004).

De acordo com o processo das feridas, irá variar a escolha dos agentes tópicos (GODOY; PRADO, 2005). Para melhorar a cicatrização, os medicamentos em uso utilizam mecanismos diferentes diversos. Dentre tais mecanismos, estão incluídos a fornecimento de energia local, como maltodextrina, mel, açúcar; a manutenção de ambiente, como hidrocoloides, hidrogel, alginatos; redução do edema da ferida, como alginatos, mel, açúcar, acemanann; aumento do nível de fatores de crescimento, como complexo tripeptideo-cobre; fornecimento de substância ativa, como colágeno e membranas biológicas; o aumento da resposta inflamatória; o aumento no fluxo sanguíneo como o laser, radiação ultravioleta e estimulação elétrica; controle da infecção e o auxílio no debridamento, como as enzimas tópicas (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006).

Embora haja uma grande diversidade de medicamentos tópicos, as plantas medicinais ainda são uma importante fonte para tratar as feridas e contribuem para o tratamento de várias condições patológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2013).

2.5 Plantas medicinais

A medicina popular é uma grande impulsionadora da utilização de plantas medicinais. Nesse sentido, é por meio da cultura local que as práticas terapêuticas são desenvolvidas no meio. Como exemplo, no Brasil, os grandes propulsores foram os europeus, a cultura indígena e negras (BARBOSA *et al.*, 2016). Tal influência contribuiu para determinadas práticas terapêuticas que buscam tratamentos para melhorias na saúde do homem (BRASIL, 2006a).

As plantas medicinais, segundo descrição da Organização Mundial de Saúde (OMS), são aquelas que tem por função prevenir, tratar ou curar processo fisiológico normal ou patológico. Estas plantas, naturais do meio ou cultivadas, são usadas, também, como composição de medicamentos (ARIAS, 1999).

Associado às plantas medicinais, nos últimos anos, buscou-se, por parte do Ministério da Saúde, estimular a utilização destas como complemento no que se refere ao sistema de saúde. Nesse sentido, foram implementadas algumas políticas visando tal estímulo, tanto no que se refere às práticas quanto ao acesso às plantas. Alguns exemplos são: a PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas -; PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b).

Além destas, há duas publicações importantes que contribuem para tal questão: a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) e a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC número 10). Esta primeira, do ano de 2009, abrange a relação de 71 plantas medicinais que devem ser analisadas e pesquisadas, a fim de serem implementadas nos serviços de saúde. (BRASIL, 2010). Já a segunda, do ano de 2010, possui uma resolução de 66 plantas medicinais que já são comprovadas com resultados benéficos na saúde humana. Algumas destas são, inclusive, indicadas para o tratamento de feridas, sendo, com isso, significativas na melhoria da saúde pública.

A grande importância destas plantas encontra-se no fato de levar a cura natural e regenerar o tecido lesado. Por possuírem componentes bioativos, são naturais e conseguem alcançar um excelente resultado. Nesse sentido, indústrias que trabalham na produção de medicamentos buscam identificar tais componentes, a fim de tentar produzir determinados efeitos farmacológicos e reproduzir ações geradas por essas plantas no organismo. Os alcaloides, flavonóides, taninos, saponinas, óleos essenciais e glicosídeos são algumas das substâncias bioativas que se encontram presentes numa planta (EDEOGA; OKWU; MBAEBIE, 2005).

Diante disso, os flavonoides podem ser encontrados em frutas, sementes, vegetais, cascas de árvores, talos e flores (NIJVELDT *et al.*, 2001). De fácil acesso, estes constituem um dos grupos fenólicos mais diversificados e importantes entre os de origem natural (SIMÕES *et al.*, 2016).

Os taninos também são caracterizados como compostos fenólicos. Estes são importantes constituintes presente e produzido pelas plantas. Sua importância está diretamente relacionada ao fato de ser responsável pela característica adstringente de certos vegetais e frutos e, sobretudo, por serem muito utilizados no tratamento de feridas e inflamações, realizado pela medicina tradicional (FUNARI; FERRO, 2006).

Em relação ao tratamento de feridas e inflamações, os taninos são responsáveis por formar uma camada protetora sobre os tecidos epiteliais lesionados, podendo ser realizado, abaixo desta, a reparação tecidual de maneira natural. Além do tratamento de feridas, os taninos possuem atividade antioxidante; ação antibacteriana, regulação proteica e enzimática e ação sobre protozoários; apresentando, também, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (MELLO; SANTOS, 2001).

Já as saponinas têm por função ser anti-inflamatória, possuir ação antifúngica e cicatrizante. As saponinas estão relacionadas, também, ao efeito imunogênico, a redução na taxa de colesterol, ao controle de parasitas, a redução da amônia e ao efeito citostático sobre células malignas (FRANCIS *et al.*, 2002).

Outros efeitos das saponinas são a ação regenerativa de cartilagens e ossos e a produção de vasodilatação. Também, combatem os radicais livres, por ter ação antioxidante; e possuem atividade antimicrobiana e associada ao sistema imune, apresentando ação antiinflamatória (CHEN; ZHANG; XIE, 2005; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR; LOPES; COLOMBARI, 2006).

Diante desse contexto, algumas plantas medicinais, já comprovadas, indicadas para cicatrização de feridas são: *Aloe Vera* (L.) (babosa), *Anacardium occidentale* L.(cajueiro), *Calendula officinalis* L. (calêndula), *Caesalpinia ferrea* Mart. (pau-ferro), *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga), *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira), *Polygonum punctatum* Elliott (erva-de-bicho), *Coronopu didymus* (L.) Smith (mastroço), *Helianthus annuus* (girassol) (BRASIL, 2010; PIRIZ *et al.*, 2014).

2.6 Vanillosmopsis erythropappa Schult - Bip (“Candeia- da- Serra”)

A espécie *Vanillosmopsis erythropappa* Schult - Bip. (“Candeia- da- Serra”), também conhecida como *Eremanthus erythropappus*, é encontrada, em geral, em solos rasos e pobres, onde suas raízes crescem e se desenvolvem no espaço entre

rochas e os ramos se tornam tortos e com casca grossa. Sobre as cascas, crescem diversos líquens e podem alcançar alguns metros em relação ao comprimento. De aparência simples, as folhas possuem aspecto aveludado, sendo, na sua parte superior, verde, e na inferior, branca. Tal espécie pode ser encontrada na Argentina, nas regiões Norte e Leste do Paraguai e, no Brasil, se concentram nas regiões centro-Oeste, sudeste e Sul (SOUZA *et al.*, 2003).

A Candeia-da-Serra tem sua relevância não só pelo uso da madeira, que possui grande durabilidade por conta de sua resistência, mas também por possuir óleos essenciais. Tais óleos são responsáveis pelo cheiro característico na queima; e possuem propriedades antibacterianas, antiflogística, dermatológica e antimicótica. Em relação a estes óleos foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas eremantina, goyazensolide, 15-desoxigoyazensolide, lychnofolide, costunolide e bisabolol (SILVÉRIO *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que alguns fatores, como os ambientais, por exemplo umidade, luminosidade, ciclo e período do dia, estação do ano; e os fatores genéticos, podem modificar a biossíntese de certas substâncias presentes nos vegetais. Tem-se, como exemplo, a mudança na composição química do óleo, retirado da madeira da Candeia-da-Terra quando comparado em períodos e locais distintos. Isso porque o metabolismo de algumas substâncias desta planta sofre com as variações (SOUSA *et al.*, 2008a).

Nesse sentido, no intuito de contribuir a análise e estudo farmacognóstico da espécie *Vanillosmopsis erythropappa* Schult - Bip, foi observado que há uma maior intensidade em relação as reações para flavonóides nos meses que correspondem ao verão. Tal intensidade pode ter sido gerada em virtude da função destes componentes em proteger os vegetais da incidência de raios ultravioletas, assim como em proteger contra bactérias, insetos, fungos e vírus. Já no que se refere aos taninos, estes estão ligados na defesa química das plantas contra microrganismos patogênicos e contra possíveis ataques de herbívoros ou invertebrados. Assim, as reações para com os flavonoides foram mais acentuadas do que para com os taninos (SOUSA *et al.*, 1991).

A espécie *Eremanthus erythropappus* tem sido utilizada durante muito tempo na medicina popular, visando combater infecções e agir nas cicatrizações. Tal espécie possui, em seu óleo essencial, uma substância conhecida por α -bisabolol. Esta

substância exerce atividades como antiulcerogênica, antimicótica e antibacteriana. Outros componentes, também presentes, são o β -pineno, β -cariofileno e β -mirceno, provenientes do extrato etanólico dessas folhas que possuem propriedades antiinflamatória e antiulcerogênica. Uma triagem fitoquímica realizada das inflorescências de *Vanillomopsis erythropappa* revelou a existência de taninos, cumarinas, flavonoides, esteroides e saponinas (DUTRA *et al.*, 2010).

Ainda que tendo sido analisadas diversas propriedades biológicas compostas pelo óleo presente na espécie *Eremanthus erythropappus*, é importante que sejam realizados mais pesquisas, experimentos e estudos farmacológicos, de modo a alcançar maior informação e conhecimento sobre o vegetal. Desse modo, será possível ter mais certeza para qual finalidade o mesmo deverá ser recomendado, principalmente no que se refere ao tratamento e cicatrização de feridas.

2.7 Atividade antibacteriana e cicatrizante da Candeia-da-Serra

O uso descontrolado de antibióticos e sem a orientação de um profissional tem gerado a existência de novos patógenos que, ao passo que são mais selecionados, se tornam mais resistentes, gerando prejuízos à saúde humana. Nesse sentido, a medicina vem buscando, por meio de estudos, encontrar novos produtos naturais, que estejam habilitados a interromper o crescimento destes patógenos, ao passo que haja, também, redução de medicamentos, realizados por substâncias sintéticas e nocivas ao organismo (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Diante disso, como muitos vegetais possuem propriedades antimicrobiana, sendo capazes de interromper o desenvolvimento de certo microrganismo, são utilizados muitos vegetais com a finalidade de cura de infecção ou até mesmo sua prevenção. Em virtude disso, a utilização de compostos como os óleos essenciais - provenientes do metabolismo secundário de plantas, por suas propriedades biológicas e por possuírem baixa toxicidade ao indivíduo - se tornou bastante empregada, sobretudo, em estudos científicos (SARTO; JÚNIOR, 2014).

Como mencionado, com a finalidade de melhorar o processo de cicatrização de ferimentos, lutando contra os processos de infecção, a Candeia-da-Serra usa de seus óleos essenciais obtidos da sua madeira. Óleos ricos em α -bisabolol, um álcool sesquiterpeno monocíclico, sem cor, viscoso, com aroma floral (PÉREZ, 2001).

O componente α -bisabolol, também previamente abordado, por apresentar características altamente anti-inflamatórias, tem sido comercializado em nível global, tornando o óleo essencial produto de alto valor comercial agregado. A espécie *E. erythropappus* tem seu óleo essencial retirado da madeira do caule ou das suas folhas. Entretanto, há uma diferença entre os compostos retirados da madeira e das folhas, sendo os obtidos das folhas fontes importantes para tratamentos anti-inflamatórios e anti-infecciosos (SOUSA *et al.*, 2008b).

Segundo a análise desses autores, substâncias provenientes dos monoterpenos e dos sesquiterpenos interrompem o crescimento do *Staphylococcus aureus*, da *Salmonella spp.*, da *Artemia salina* e da *Candida albicans*. Estas substâncias estão presentes nos óleos essenciais obtidos da Candeia-da-Serra. Sendo rico em terpenos, como o β -pineno, E-cariofileno, β -mirceno, α -humuleno e α -copaeno, o óleo essencial proveniente dessa espécie, possui grande capacidade antimicrobiana (SOUSA *et al.*, 2008b).

Já a capacidade antibacteriana do óleo essencial da Candeia-da-Serra está relacionada também ao mirceno e ao linalol, terpenos, encontrados em abundância nessa espécie (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

A integridade e o funcionamento da membrana celular dos patógenos são destruídos pelos terpenos, presentes na Candeia-da-Serra, que geram mudança de potencial na membrana celular do patógeno, levando a perda do material celular e interferência na cadeia respiratória. Embora não causem a lise celular em todos os casos, promovem descontinuação da parede celular do patógeno, convergindo para sua inviabilidade biológica (PROBST, 2012).

O óleo essencial dessa espécie também tem sido utilizado na indústria farmacêutica e cosmética para formulação de pomadas, loções e géis em virtude do seu potencial cicatrizante, dado pelos constituintes sesquiterpenoídicos, com o composto α -bisabolol, por exemplo (SILVERIO, 2004; SILVERIO *et al.*, 2008).

2.8 Cultivo e Manejo da Candeia da Serra

A Candeia faz parte da família Asteracea, do gênero *Eremanthus* e possui em média 22 espécies, das quais a *Eremanthus erythropappus* é a de maior ocorrência no estado de Minas Gerais. Se desenvolve com maior rapidez em campos abertos, sendo uma espécie heliófila, com distribuição de diâmetro decrescente e arvores atingindo até 32,5 cm, com média de 15 cm. Seu florescimento ocorre de julho a setembro, no período mais seco e frio do ano, e sua frutificação de agosto a setembro, podendo se estender até novembro, período de temperatura mais elevada. É importante notar que se desenvolve facilmente em locais de solo pouco fértil, preferencialmente em áreas com altitude variando entre 400 e 2.200 m (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012).

No Brasil existem cinco indústrias de óleo de candeia natural bruto e três de alfabisabolol, o obtido a partir da destilação do óleo. Embora a exploração da espécie e comercialização dos derivados gerem boa fonte de renda ao país, não há um manejo consolidado voltado para o uso comercial mais planejado. Ainda não existe progênies ou clones testados para plantio em algumas regiões, de forma que deve ser utilizado fonte local de sementes, colhidas da árvore na região própria do plantio, evitando seu plantio comercial em regiões que não tenham ocorrência natural, como a área que se estende de São Paulo à Bahia (SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012).

O preparo do terreno deve ser feito por aração, a adubação pode ser a utilizada para plantios das espécies nativas, com média de 100 a 150 gramas de superfosfato simples por cova ou formulação N.P.K. As mudas podem ser feitas em sacos plásticos ou em tubetes e para um bom manejo é fundamental a cubagem rigorosa das árvores, e o ajuste do peso seco, de óleo, do número de moirões e das equações volumétricas SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012).

Segundo Silva *et al.* (2014) o plantio da Candeia em espaçamentos maiores – 1,5 x 3,0 m – é preferível por ser mais lucrativo e por apresentar menor risco de resultados desfavoráveis. Ainda, segundo os autores, a idade ótima de corte, sendo a melhor rotação econômica, é de 12 anos. É importante notar ainda que no sistema de manejo, a quantidade de óleo produzida por metro cúbico é a mesma, independentemente do tamanho da árvore.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito cicatrizante da pomada preparada a partir dos extratos das folhas de *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz – Bip, utilizando como solventes o hexano e o etanol, *in vitro* e em *in vivo* em feridas cutâneas induzidas em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter os extratos em hexano e etanol das folhas de *V. erythropappa* Schultz– Bip;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos obtidos empregando o teste de proliferação celular *in vitro* em culturas celulares de fibroblastos humanos;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos sobre *Staphylococcus aureus*;
- ✓ Avaliar o extrato ativo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas GC/MS, bem como identificar substâncias biotivas;
- ✓ Avaliar o extrato ativo por cromatografia líquida LC/MS acoplada a espectrometria de massas, bem como a identificação de substâncias biotivas;
- ✓ Avaliar o efeito cicatrizante do extrato ativo das folhas de *V. erythropappa* Schultz– Bip *in vivo* através do índice de contração da ferida;
- ✓ Realizar análise qualitativa do colágeno, bem como a identificação e quantificação das fibras colágenas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

As folhas de *V. erythropappa* Schultz – Bip foram coletadas no entorno da cidade de Ouro Preto MG, no distrito de Lavras Novas. Posteriormente foi realizada a confecção da exsicata, identificada e depositada (figuras 3 e 4) no Herbário da Universidade Federal de Viçosa – MG, localizado no Departamento de Biologia Vegetal – UFV. O material vegetal foi colocado em estufa com ventilação forçada a 40°C até peso constante. Posteriormente foi moído e acondicionado até a preparação dos extratos em hexânico e etanólico. Essa fase foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais (BioNat), localizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da Universidade Federal de Viçosa – MG.



Figura 3 – Exsicata das folhas de *V. erythropappa* Schultz – Bip.

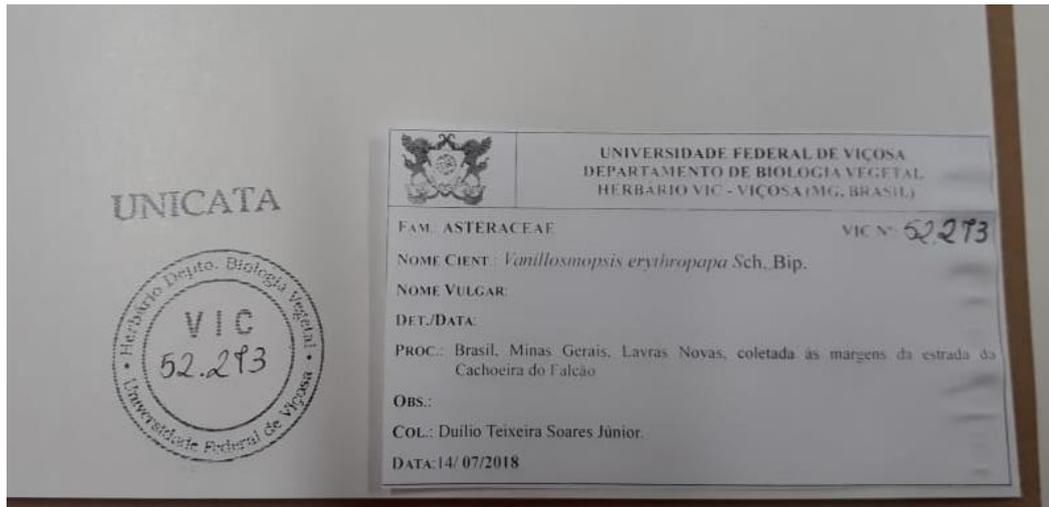


Figura 4 – Identificação da exsicata no herbário da UFV.

4.2 Preparação do Extrato

O extrato das folhas foi preparado por meio do método de maceração e remaceração. Para a produção dos extratos vegetais foram utilizados 1500g das folhas moídas. Cada 500g da droga vegetal foi macerada em 3L de cada solvente (hexano PA e etanol PA) ao abrigo da luz, até a exaustão. O macerado foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo. Os dois extratos assim obtidos a partir dos solventes foram armazenados em freezer a 4°C até a sua utilização.

4.3 Preparação da Pomada

As pomadas foram obtidas em concentrações específicas (1%, 3% e 5%), utilizando como veículo um composto formado por lanolina anidra 30%, BHT 0,05% e vaselina qsp.

4.4 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/MS)

O perfil do extrato ativo foi analisado através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O extrato foi preparado na concentração de 10 mg/mL utilizando como solvente hexano. A amostra foi filtrada com o auxílio de seringas descartáveis (3 mL) e filtros *milipore* (20 µm). O volume da primeira passagem no filtro foi descartado e o restante foi transferido para *vials* (1,5 mL), que foram, então, fechados.

Foi utilizado um aparelho da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 μm) e hélio como gás de arraste. A injeção ocorreu no modo split (razão 1:10). A temperatura do injetor e da fonte foi de 290 °C. Para a coluna, a temperatura inicial foi de 80 °C por 5 minutos, aumentando até 285 °C, com taxa de 4 °C/minutos e permanecendo nesta temperatura durante 40 minutos. A temperatura na interface do sistema foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 700 Da.

A identificação dos compostos presentes no extrato bruto foi realizada através de comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles existentes no banco de dados do aparelho e com os dados da literatura.

4.5 Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC/MS)

Alíquotas de 300 μL dos extratos foram colocadas em frascos e 5 μL injetados no sistema LC/MS no Núcleo de Biologia Molecular (NuBioMol) da UFV. Para todas as análises de LC/MS foram utilizadas uma Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance (UHPLC; modelo 1200 Infinity) com coluna de cromatografia (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1,8 μm , 2,1x50 mm) e vazão de 0,3 mL / min, acoplada online em um espectrômetro de massa QQQ (triplo quadrupolo; Agilent6430). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 μm , 2,1 x 50 mm) (Agilent) e uma coluna de proteção Zorbax SB-C18 de 1,8 μm (Agilent). A fase móvel consiste de tampões A (ácido acético aquoso 0,02%) e B (acetonitrila ácido acético 0,02%) e um gradiente de % B: 5% x 0 min⁻¹; 60% x 11 min⁻¹; 95% x 13 min⁻¹; 95% x 17 min⁻¹; 5% x 19 min⁻¹; e 5% x 20 min⁻¹. A taxa de fluxo do solvente é 0.3ml x min⁻¹ em uma coluna a 30 ° C. O espectrômetro de massa é operado pelo modo positivo de acordo com o método de detecção de flavonóides. O método de ionização usado na espectrometria de massa foi um ESI (Ionização por Electrospray) sob as condições: temperatura do gás de 300°C, vazão de nitrogênio de 10 L x min⁻¹, pressão do nebulizador de 35 psi e tensão capilar de 4000 V. Os dados brutos LC/MS gerados foram analisados pelo pacote Skyline utilizando como entrada uma lista de transição sem tempos de retenção.

4.6 Avaliação da Proliferação Celular *in vitro* em Culturas Celulares de Fibroblastos Humanos

O teste de estimulação da proliferação celular foi adaptado de Ponnusamy *et al.* (2015). O meio de cultura utilizado para cultivo e manutenção das células foi o RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado (SFB, 10%), penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Os fibroblastos humanos da linhagem NIH3T3 foram mantidos em estufa, a 37° C, em ambiente enriquecido por CO₂ a 5%.

As células estoque, em crescimento subconfluente, foram centrifugadas e ressuspensas em uma garrafa de cultivo contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da suspensão de células foi retirada para contagem e definição do volume de inóculo, em câmara de Neubauer.

As células foram inoculadas a uma concentração de 5×10^3 células por poço, em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada por aproximadamente 24 h, em estufa a 37° C, 5% CO₂, permitindo que as células se aderissem e se espalhassem nos poços. O meio de cultura anteriormente adicionado (RPMI, 10% SFB) foi então substituído por novo meio acrescido do extrato de folhas no ensaio subsequente. As concentrações utilizadas no teste foram de 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 µg/mL para Os extratos da planta em estudo. Como controle foram utilizado DMSO nas mesmas proporções dos testes.

Após a adição do meio novo acrescido das diferentes concentrações dos extratos e de SFB, a placa foi então incubada nas mesmas condições por mais 48h. A seguir, foram adicionados 10 µL de solução contendo o indicador MTT na concentração de 5 mg/mL, e as placas foram incubadas por mais 4h. O conteúdo das placas foi esgotado em descarte adequado e, aos poços, foram adicionados 200µL de DMSO. O DMSO permite a lise celular e, conseqüentemente, a liberação do indicador colorimétrico derivado do MTT.

A quantificação do indicador foi realizada em leitor ELISA em $\lambda = 540$ nm. Os resultados foram apresentados na forma de gráfico obtido no programa PRISMA®, para indicar o efeito produzido pelas diferentes concentrações dos estímulos em relação ao padrão (% de viabilidade celular).

A comparação entre os valores de absorbância adquiridos após o MTT foi utilizada para comparação estatística entre os tratamentos (teste-T) com $\alpha = 5\%$.

4.8 Avaliação da Proliferação Celular *in vivo*

Para a realização do estudo, foram aplicados os princípios éticos da experimentação, submetido à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, aprovado segundo o parecer de número de protocolo 52-2018 em ANEXO. Foram utilizados 90 ratos albinos adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, todos machos, linhagem Wistar, com idade média de 120 dias, saudáveis, com massa corporal entre 250g e 350g, provenientes do Biotério Central da UFV.

O tamanho da amostra foi baseado na Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 da ANVISA, que tem por objetivo indicar métodos padronizados para estudos de toxicologia pré-clínica no Brasil, os quais visam no futuro o registro e renovação de fitoterápicos. O item três do anexo desta resolução determina o número mínimo de seis animais por grupo experimental, o que dispensa, neste caso, a necessidade do uso de fórmulas estatísticas para obtenção do número da amostra. Antes de iniciar o estudo, os animais ficaram por 30 dias em período de adaptação, na área experimental do Laboratório de Biofarmacos da UFV. Durante esse período todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais cobertas com maravalha, com temperatura controlada na faixa de 20°C a 25°C, fotoperíodo de 12h, com água e ração específica (pellet Purina Labina ®) para roedores *ad libitum*.

4.9 Procedimento Cirúrgico

Os animais passaram por anestesia prévia, realizada por um Médico Veterinário, para que pudesse ser feita a indução das feridas, a qual foi realizada pelo investigador do estudo, sob acompanhamento desse médico.

Os animais foram sedados e anestesiados como recomenda Massone (2011), usando 10mg/Kg de xilazina 2% (Anasedan®), e 50mg/Kg de cloridrato de quetamina (Dopalen®), adicionados na mesma seringa e administrado por via intraperitoneal. A anestesia foi verificada pela ausência de reflexo palpebral e redução da frequência cardíaca e respiratória. Uma vez anestesiados, foi realizada a tricotomia do dorso dos animais, com auxílio da lâmina de barbear.

Após a tricotomia realizou-se a assepsia com solução de álcool etílico 70% na região tricotomizada. Para padronizar o tamanho da ferida, utilizou-se um tubo de ensaio de 10ml para coletar sangue, devidamente desinfetado, que quando pressionado contra a pele, delimitou uma área aproximada de 1cm². Os cortes foram seccionados utilizando lâmina de bisturi N° 11, tesoura curva e pinça anatômica dente de rato, até a exposição da fáscia muscular (Figura 5).



Figura 5 – Rato Wistar anestesiado com lesão realizada cirurgicamente no dorso.

4.10 Organização dos Grupos Experimentais e Tratamento Tópico das Lesões

Os 90 animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, entre grupos controles (G4 – Pomada Veículo, controle negativo e G5 – Fitoscar®, controle positivo) e experimentais (G1 – Pomada com 1% de extrato, G2 – Pomada 3% e G3 – Pomada 5%) (Tabela 1). Após a indução das feridas nos ratos, os animais receberam diariamente o equivalente a 1g da pomada de acordo com tratamento do seu grupo experimental, utilizando técnica asséptica. Os curativos foram realizados em intervalo de 24h, utilizando a mesma técnica e no mesmo horário, até o 21º dia de pós-operatório (PO). Todos os procedimentos pós-operatórios foram realizados pelo mesmo investigador com ajuda de estudantes, previamente treinados, do curso de Bioquímica e Biologia da UFV.

Tabela 1 – Tratamentos experimentais por grupo de animais, sendo 18 animais por grupo.

GRUPOS	TRATAMENTOS	DOSES
G1 – Pomada com 1% do extrato	Feridas tratadas com a formulação contendo o 1% do extrato ativo.	01 grama
G2 – Pomada com 3% do extrato	Feridas tratadas com a formulação contendo o 3% do extrato ativo.	01 grama
G3 – Pomada com 5% do extrato	Feridas tratadas com a formulação contendo 5% do extrato ativo.	01 grama
G4 – Pomada Veículo	Feridas tratadas com pomada Veículo.	01 grama
G5 – Pomada Fitoscar®	Feridas tratadas com pomada Fitoscar®.	01 grama

4.11 Análises Macroscópicas das Feridas

As feridas em tratamento foram avaliadas pelo Índice de Contração (IC), mensurado no 7°, 14° e 21° dias após a execução das feridas, com uso de paquímetro manual, em duas direções, segundo Borges *et al.* (2007), que recomendam tomar como referência os pontos mais distantes na horizontal e vertical, formando um ângulo de 90°. Após este procedimento, multiplica-se os valores encontrado na horizontal e vertical, proporcionando o valor real da ferida, conforme a figura 6.

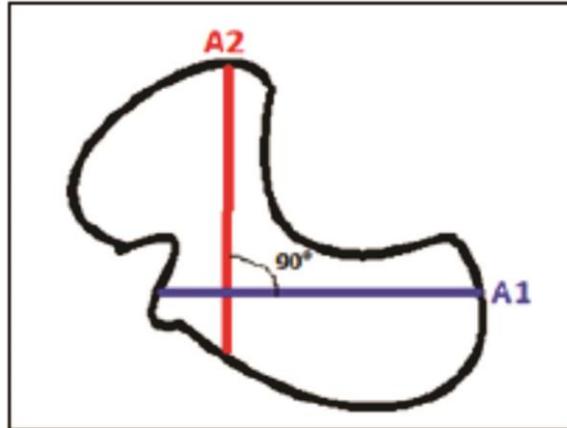


Figura 6 – Determinação da área da ferida por medição. A1: área horizontal; A2: área vertical. (Ângulo de 90 graus)

A área da ferida foi calculada em centímetros quadrados, multiplicando-se os valores em centímetros de A1 e A2 de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Área da ferida em cm}^2 = A1 \times A2$$

A contração das feridas após os tratamentos das formulações foi obtida a partir da diferença da área inicial da ferida em centímetros quadrados e a área da ferida ao final do experimento, dividida pelo produto da área inicial vezes 100, como mostra a equação abaixo (BORGES *et al.*, 2007):

$$\text{Contração da ferida} = \frac{\text{Área inicial em cm}^2 - \text{área do momento ferida em cm}^2 \times 100}{\text{Área inicial em cm}^2}$$

Cálculo da contração da ferida.

O tempo de tratamento e coleta de tecido para avaliação histológica foi de 7, 14 e 21 dias, sendo realizada eutanásia de seis animais por grupo nos dias de tratamento mencionados, até se completarem os 21 dias do tratamento dos grupos em experimento, como mostra a tabela 1 abaixo.

4.12 Análises Quantitativa do Colágeno

As feridas foram retiradas com margem de 01 cm de pele íntegra ao redor da lesão, com profundidade até a fáscia muscular. As amostras de pele foram imediatamente fixadas em solução de formol 10% por 24h, e posteriormente inseridas em frascos com álcool 70% até a confecção das preparações histológicas. Para a confecção das lâminas, as amostras de pele foram desidratadas em etanol, clareadas em xilol, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas rotineiramente com coloração *picrosirius*, um tipo de coloração que, ao ser observada em microscópio de luz polarizada, marca: Olympus, Modelo BX-41 U- pot, que permite analisar, de forma qualitativa, as fibras de colágeno, em especial as tipo I e tipo III, uma vez que demonstra diferença na interferência e intensidade das cores e na birrefringência dos tecidos que sofreram essa coloração (SWEAT; PUCHTLER; ROSENTHAL, 1964).

A identificação e quantificação das fibras colágenas maduras (tipo I) e imaturas (tipo III) foi feita por meio da técnica de microscopia óptica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada.

As imagens foram captadas por uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio utilizado, digitalizadas e analisadas pelo aplicativo Image ProPlus® (mídia cibernética, São Paulo, Brasil), em aumento de 400X. Para análise das imagens, foi utilizado o sistema RGB (Red, Blue, Green), no qual fibras colágenas maduras (tipo I) se apresentam com tons vermelho e laranja e fibras colágenas imaturas (tipo III) se apresentam com tons verdes. Em cada campo analisado foi calculada a área ocupada por colágeno maduro e imaturo, desconsiderando as áreas escuras e de outras tonalidades.

4.13 Imunoensaio para VEGF

As alíquotas de soro dos animais em estudo usadas para o VEGF foram congeladas a -80°C para posterior análise. Para a determinação do VEGF foi utilizado o método enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) através do kit Human VEGF Elisa Kit invitrogen®. Os testes em todas as amostras foram realizados em triplicata.

O kit contém placas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal e padrão na concentração de 1.500 pg/mL, além de tampões, solução de bloqueio da reação e conjugados cromógenos. Com o padrão fornecido, foram feitas diluições para a construção de uma curva-padrão e determinação da concentração das amostras. O kit orienta a realização da reação em etapas e todos os passos devem ser realizados a temperatura ambiente.

Inicialmente, adicionou-se 50 µL do tampão de incubação em todos os poços, exceto os poços que foram selecionados para branco. Em seguida foi adicionado 100 µL dos padrões diluídos nos poços selecionados. Nos poços da amostra e dos controles foi adicionado 50 µL de tampão diluidor seguido de 50 µL da amostra. Os poços que foram usados como branco permaneceram vazios.

As placas foram tampadas e incubadas por 2 horas. Logo após, a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem. Após a lavagem, foi adicionado 100 µL de solução de conjugado de biotina Hu-VEGF em cada poço, exceto nos poços selecionados para branco.

Em seguida, a placa foi novamente coberta e incubada por 1 hora e, após esse tempo, a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem. Em seguida, foi adicionado 100 µL de solução estreptavidina-HRP em cada poço, exceto nos poços reservados para o branco.

A placa, então, foi coberta e incubada por 30 minutos. Em seguida a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem.

Finalmente, foi adicionado 100 µL de cromógeno estabilizado em todos os poços, incubando no escuro até a solução ficar azul. A seguir, foi adicionado 100 µL de solução de bloqueio em todos os poços, e assim, a solução mudou de azul para amarelo. A leitura foi realizada com o leitor Elisa Spectramax em 450 nm.

4.14 Eutanásia

Após 7, 14 e 21 dias de tratamento, seis animais de cada grupo foram eutanasiados com a administração de uma dose intravenosa de 100mg/kg do fenobarbital tioepental, ou seja, quatro vezes maior do que a dose anestésica que é de 25mg/kg, segundo as diretrizes brasileiras de prática de eutanásia (BRASIL, 2012). Posteriormente, após os animais entrarem em anestesia profunda, seguiu-se a exsanguinação por punção cardíaca a fim de obter amostras de sangue para análises bioquímicas. Finalmente, a eutanásia foi realizada por choque hipovolêmico (BORGES *et al.*, 2007).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos testes *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com as comparações de médias realizadas pelo teste de Tukey. Para a avaliação estatística dos resultados de imunoensaio, foi utilizado teste estatístico *One way Anova* não pareado com teste-T. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05\%$, para diferenças estatísticas significativas.

Para dimensionar os valores de retração da ferida induzida das análises macroscópicas da ferida foi construído um gráfico a partir teste estatístico *One way Anova* não pareado com teste-T para indicar o efeito produzido pelas diferentes concentrações

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2 Análise da Proliferação Celular *In Vitro* em Culturas Celulares de Fibroblastos Humanos

As tabelas 3 e 4 abaixo representam as porcentagens de vida celular e o desvio-padrão frente à concentração dos extratos hexânico e etanólicos, respectivamente. Os gráficos que representam essas tabelas estão expostos nas figuras 7 e 8 a seguir.

Tabela 2 – Porcentagem de vida celular em função da concentração do extrato Hexânico.

Concentração - Extrato Hexânico	% Viabilidade celular (%Vida)	(+/-) dp*
1600 µg/mL	95,349	19,336
800 µg/mL	182,500	9,757
400 µg/mL	177,267	18,202
200 µg/mL	168,372	15,210
100 µg/mL	178,779	19,927
50 µg/mL	162,267	10,765

*Desvio-Padrão.

Tabela 3 – Porcentagem de vida celular em função da concentração do extrato Etanólico.

Concentração - Extrato Etanólico	% Vida	(+/-) dp*
1600 µg/mL	32,907	8,069
800 µg/mL	34,535	3,642
400 µg/mL	37,733	1,237
200 µg/mL	37,733	6,912
100 µg/mL	74,709	4,187
50 µg/mL	82,733	7,575

*Desvio-Padrão.

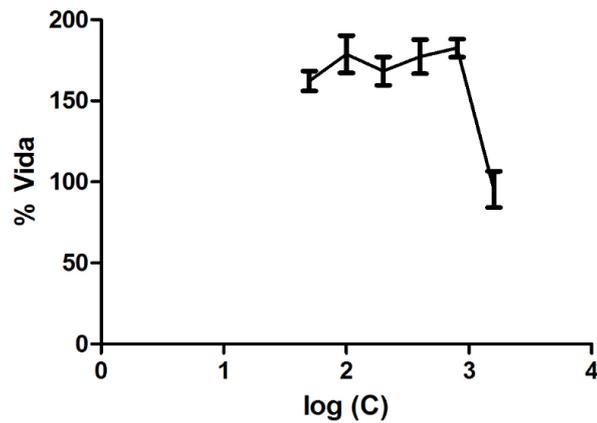


Figura 7 – Porcentagem de viabilidade celular em extrato hexânico.

Nas diferentes concentrações testadas do extrato hexânico (figura 7), foi observada uma porcentagem de vida celular quantitativa nas 05 primeiras concentrações utilizadas, contudo, a partir da concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ a porcentagem de vida celular foi significativo estatisticamente em relação às outras concentrações testadas.

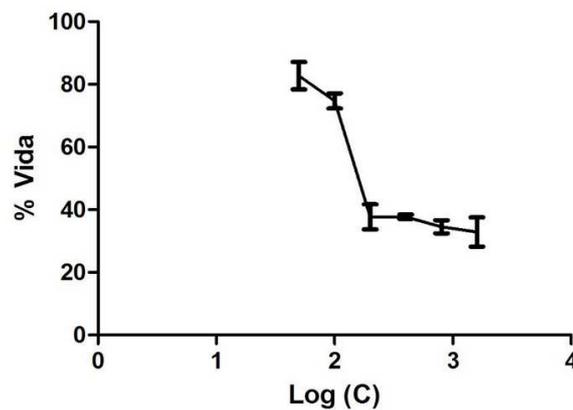


Figura 8 – Porcentagem de vida celular em extrato etanólico (toxicidade do etanol).

Nas diferentes concentrações de extrato etanólico testada verificou-se uma diminuição da porcentagem de vida celular (figura 8). E que com o aumento das concentrações testadas houve um aumento da toxicidade celular.

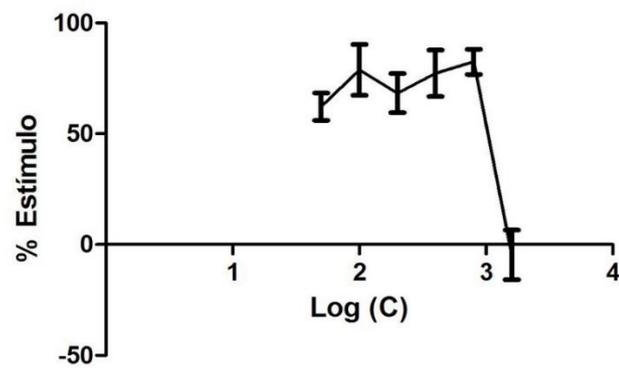


Figura 9 – Ação do extrato hexânico em relação ao controle

A ação do extrato hexânico (figura 9) nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ e 800 $\mu\text{g/mL}$ foi satisfatória em relação ao controle (DMSO), sendo que apenas a última não apresentou estímulo ao crescimento celular satisfatório. Portanto, a partir da concentração 1600 $\mu\text{g/mL}$ a ação começa a se tornar tóxica para o desenvolvimento e conseqüente proliferação celular.

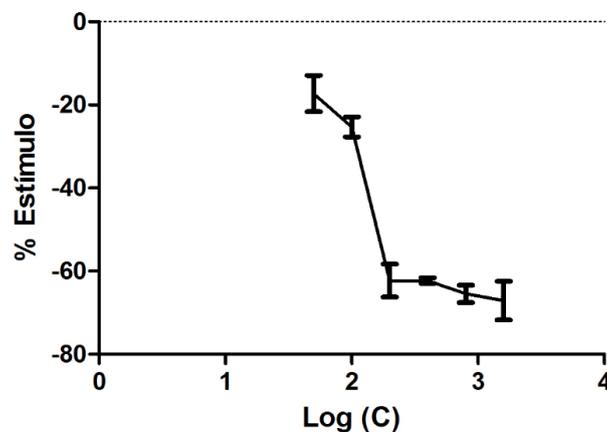


Figura 10 – Ação do extrato etanólico em relação ao controle.

O extrato etanólico se apresentou tóxico para o crescimento celular nas diferentes concentrações testadas (figura 10), contudo, é possível verificar que em concentrações menores houve uma diminuição da toxicidade celular, projetando um possível aumento na porcentagem de estímulo celular em concentrações menores do que as testadas no experimento.

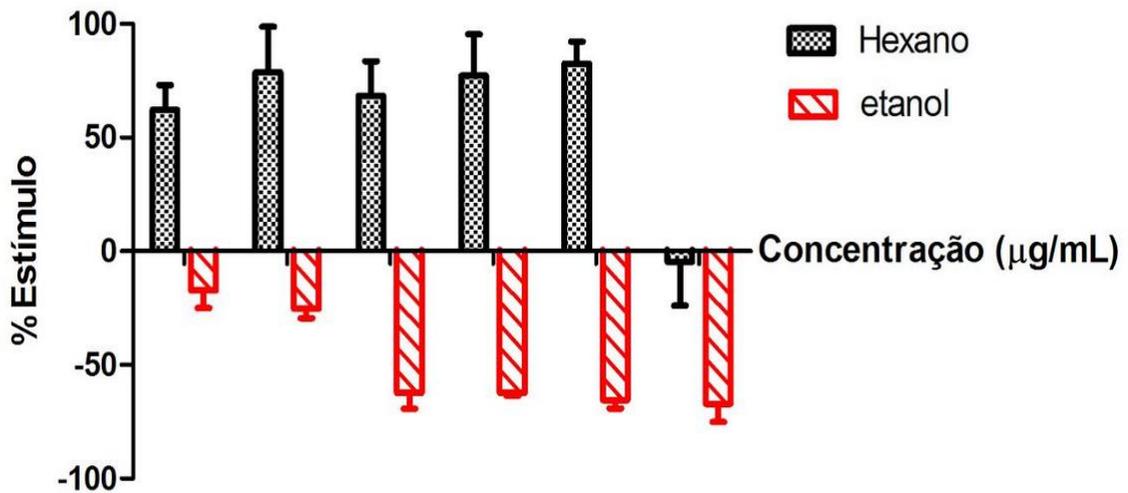


Figura 11 – Estímulo de crescimento.

Comparando os dois extratos (figura 11), é possível verificar que nas diferentes concentrações utilizadas no experimento o extrato hexânico se apresentou mais eficiente ao crescimento celular do que o extrato etanólico, já que este se mostrou tóxico ao crescimento celular *in vitro*.

Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados para verificar o potencial antioxidante e citotóxico de extratos obtidos de diferentes espécies vegetais a fim de obter resultados úteis e positivos para a saúde do ser humano. Por exemplo, em estudo de análise semelhante, realizada sobre a espécie *Garcinia brasiliensis* por Figueiredo (2013), o extrato etanólico teve sua citotoxicidade, frente à cultura de células de fibroblastos, avaliada *in vitro* e os resultados demonstraram que na concentração de 25 µg/ml o extrato reduziu em 40% a viabilidade das células. Essa citotoxicidade apresentada pelo extrato no teste *in vitro* foi atribuída pela autora aos baixos teores de flavonóides presentes no extrato desse vegetal, em comparação com outros, o que provoca redução na atividade antioxidante do mesmo.

Ainda, Silva *et al.* (2015) avaliaram o potencial citotóxico da *Annona muricata* L., em estudo *in vitro*, e observaram que o extrato etanólico em concentração superior a 80 µg/ml é potencialmente letal ao crescimento de células humanas de diferentes linhagens tumorais.

De igual maneira, Delving (2015) avaliou o efeito terapêutico e o potencial citotóxico e antioxidante da *Calyptanthes grandifolia* em teste *in vitro* pelo método de Alamar Blue, usando células não metabolizadoras. A autora observou que o extrato etanólico não apresentou citotoxicidade, mantendo a viabilidade celular aumentada em todas as concentrações testadas, além disso, apresentou potencial antioxidante, inibindo significativamente a liberação de TNF- α . Já, para o extrato hexânico, a redução da viabilidade celular ocorreu somente em concentração superior a 200 $\mu\text{g/ml}$. Nesse estudo, o potencial anti-inflamatório, antioxidante e anticarcinogênico dos extratos dessa planta foi atribuído à presença de terpenóides e polifenóis.

Tendo em vista o resultado desta análise, que mostrou ser o extrato hexânico o mais eficiente para o crescimento celular, utilizou-se este extrato para formulação das pomadas. A seguir estão apresentadas as análises feitas com base nessas formulações.

6.3 Análise do Extrato ativo por Cromatografia Gasosa - espectroscopia de massa (CG/MS)

O extrato hexânico foi injetado no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas, pois é uma das mais utilizadas na análise química, se destacando como uma ferramenta extremamente útil para separação de misturas complexas e para separação dos componentes de um sistema, com eficiência e rapidez, determinando o número de componentes de uma mistura, apontando a presença de impurezas e muitas vezes, servindo para esclarecer a identidade de um composto.

O resultado apresentado para os componentes do extrato hexânico identificados por Cromatografia Gasosa pode ser observado nas figuras 12 e 14. O cromatograma detectou a presença de alguns compostos importantes para o processo de cicatrização celular, como; Lupenona; Acetato de Lupeol;) α -amirina; Lupeol; Friedelan-3-one; Acetato de Lupanol; e α -cariofileno.

O composto Lupeol (7), cujo pico se encontra no tempo de retenção $T_R = 21,20$ como um dos mais abundantes, parece ser um dos responsáveis pela atividade cicatrizante encontrada no extrato, tendo em vista que há relatos na literatura da sua atividade como cicatrizante (BESERRA, 2019).

Por outro lado, o composto friedelina ou friedelan-3-one também tem efeito na cicatrização, uma vez que age estimulando a angiogênese (CARMO et al., 2016). Além disso, os compostos β -cariofileno e β -amirina que também apresentam atividade cicatrizante. Esses dados corroboram com a atividade cicatrizante apresentada pelo extrato hexânico nos estudos de Parente (2008) e Perterle (2017).

De acordo com Nunes (2013) os triterpenóides apresentam propriedades farmacológicas diversas, como anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, analgésicas, antibióticas, antimicóticas, imunomoduladoras, virostáticas e tónicas. Silva, Bezerra e Fernandes (2018) também encontraram triterpenos no extrato hexânico do urucum (*Bixa orellana*), os quais, segundo eles, são compostos com atividade biológica farmacológicas comprovada, como anti-inflamatória e antimicrobiana, e que estão envolvidos no potencial fitoterápico do urucum, para tratar problemas de pele, queimaduras entre outros.

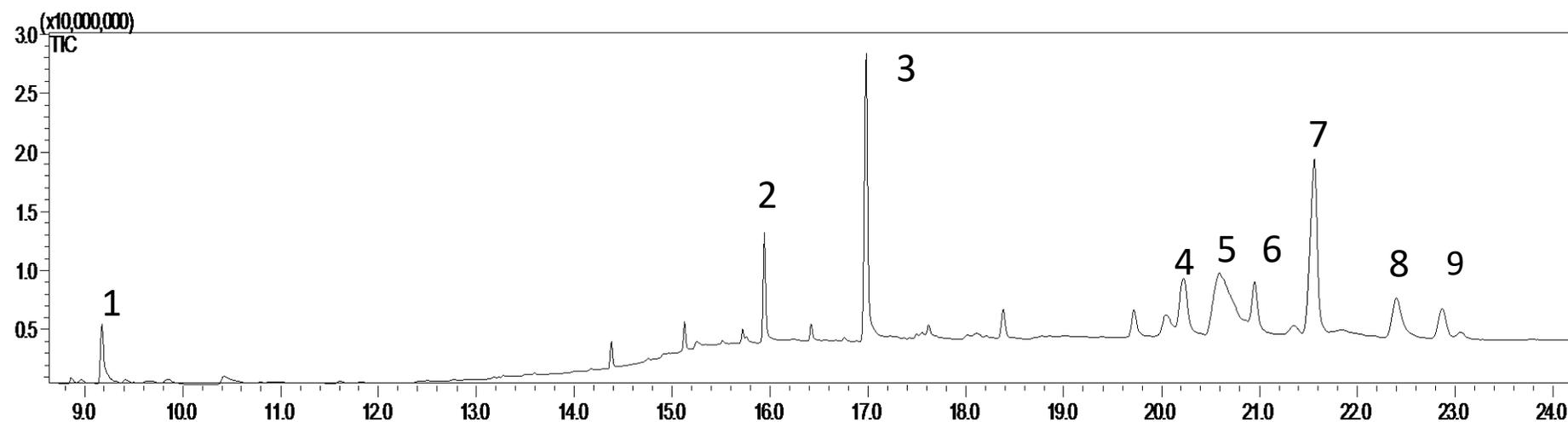
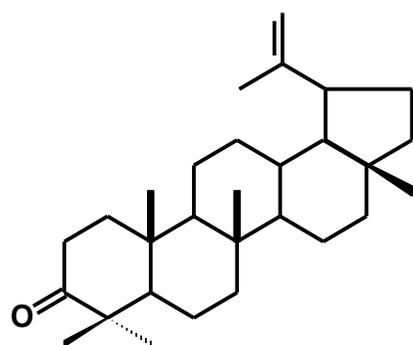
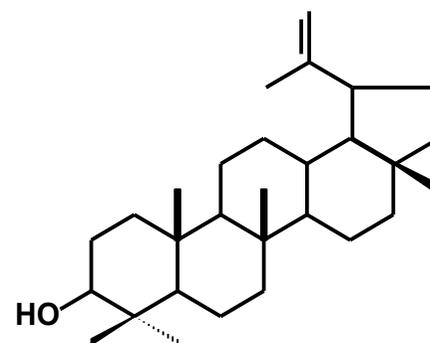


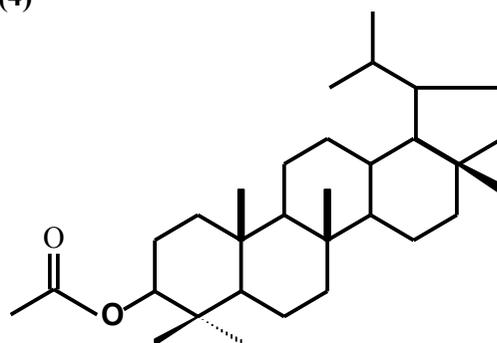
Figura 12 – Cromatograma do extrato hexânico das folhas de *V. erythropappa* Schultz – Bip obtido pela análise de CG-EM. Picos numerados de 1 a 9: 1) α -cariofileno; 2) 2-metil-hexacosano; 3) Tetracontano; 4) Lupenona; 5) Acetato de Lupeol; 6) α -amirina; 7) Lupeol; 8) Friedelan-3-one; 9) Acetato de Lupanol, correspondem aos compostos de maiores intensidades no extrato.



Lupenona
(4)



Lupeol
(7)



Acetato de lupanol
(9)

Figura 13 – Estrutura do Lupeol e seus derivados.

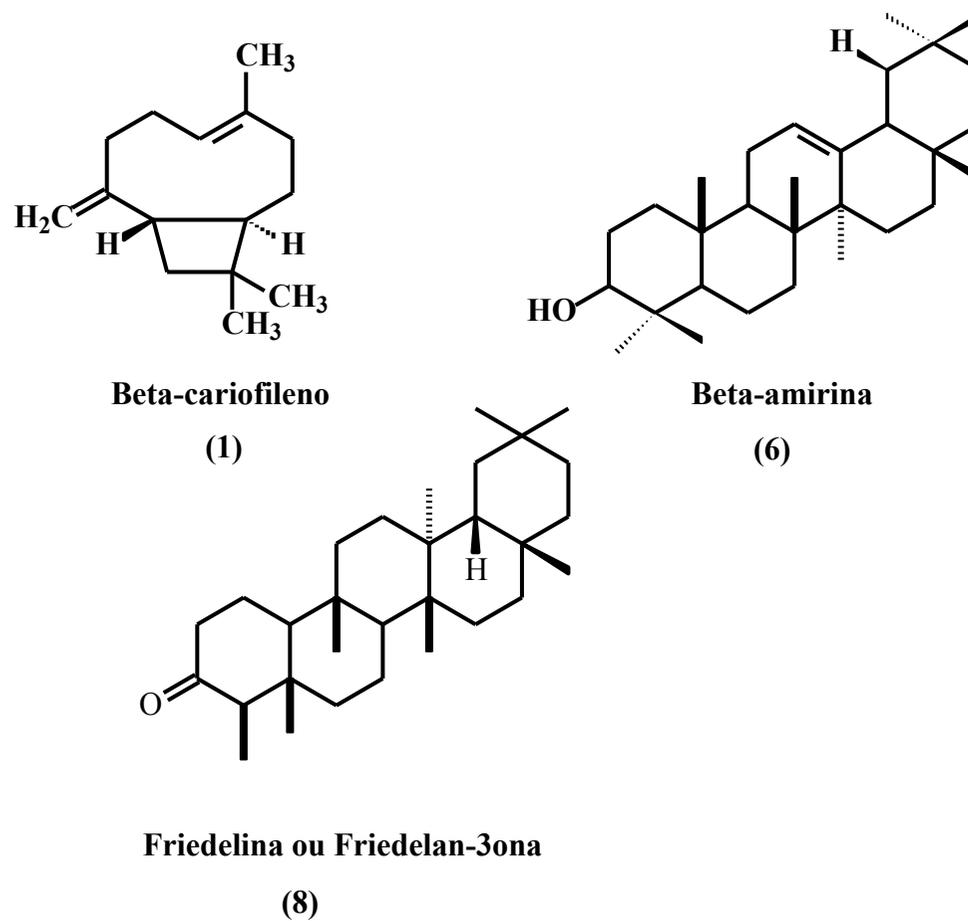


Figura 14 – Estrutura do α -cariofileno, α -amirina e da friedelina ou friedelan-3-one.

6.4 Análise do Extrato ativo por Cromatografia Líquida (Método LC/MS)

A análise do extrato ativo por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas permitiu detectar a presença de dois flavonóides: Apigenina e Luteolina (Figuras 15, 16 e 17).

A administração de fitoterápicos no tratamento de feridas deve considerar todas as fases da cicatrização, que envolvem as fases inflamatórias, proliferativas e de maturação. Nesse propósito, o papel dos flavonóides na cicatrização de feridas consiste no seu potencial anti-inflamatório (NIJVELDT et al., 2001), pois, além de inibir a COX-2 e a desgranulação de neutrófilos, também diminui a adesão de células inflamatórias ao endotélio e a resposta inflamatória (LEITE *et al.*, 2015). Sobre isso, a literatura mostra que a ação anti-inflamatória e cicatrizante das plantas está diretamente relacionada aos flavonóides (MANGA et al, 2004; SALA et al., 2003; ASONGALEM et al., 2004; VIANA et al. 2003).

De forma geral, os flavonóides têm atividade antioxidante, diminuindo a ativação do complemento, a adesão celular endotelial e a resposta inflamatória. Além disso, apresentam propriedades cicatrizantes por inibir a produção de metaloproteinase-9 em queratinócitos em humanos (MAJTAN et al., 2013).

De acordo com Araújo (2010), em doses específicas, os flavonóides provocam aumento na síntese de proteína, o que, conseqüentemente, promove maior síntese de colágeno e elastina, resultando assim em melhora da cicatrização. A autora mostrou que animais submetidos ao tratamento com extrato contendo flavonóides tiveram, à análise histológica, maior organização das fibras colágenas da derme em virtude da formação eficaz da epiderme que remodelou a ferida e proporcionou melhor cicatrização. Segundo a autora os flavonóides atuam como anti-inflamatórios, e em especial a apigenina e a luteolina se mostram eficazes para o processo cicatrizante, isso porque atuam em uma das fases da cicatrização – a fase inflamatória – inibindo a peroxidação lipídica e a agregação plaquetária (em virtude do aumento de AMPc).

A presente análise mostrou teores consideráveis dos flavonóides apigenina e luteolina no extrato hexânico de *V. erythropappa* Schultz – Bip, o que justifica o seu efeito cicatrizante, comprovado nas análises posteriores.

A apigenina é um flavonóide presente em diversas ervas, vegetais e frutas, com variadas funções biológicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral e cicatrizante (ZHANG et al., 2015). Hou et al. (2013) relataram que a apigenina tem efeito sobre a derme e a epiderme, de forma que estimula a diferenciação epidérmica, a síntese e secreção lipídica, e a produção do peptídeo antimicrobiano cutâneo. De acordo com Zhang et al. (2015) a apigenina induz a síntese de colágeno tipo I e III de fibroblastos in vitro, aumenta a densidade dérmica, e promove maior deposição de colágeno na derme, o que confirma o uso desse composto para o tratamento de feridas cutâneas.

A apigenina, segundo Júnior et al. (2016), também foi encontrada na romã (*Punica granatum* L.), respondendo pelo seu efeito cicatrizante sobre úlceras induzidas em dorso de língua de ratos Wistar. Em análise semelhante, o estudo de Boeing (2015) mostrou que o extrato proveniente das folhas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) apresenta grande poder terapêutico como cicatrizante gástrico em virtude da presença de flavonóides, em especial, a luteolina e a apigenina.

Süntar et al. (2013) demonstraram que o potencial cicatrizante do extrato de *Helichrysum graveolens* (Bieb.) se deve a presença da apigenina, confirmada por meio de análise cromatográfica. Shukla et al. (2016) também mostraram que hidrogéis carregados de apigenina, isolada do extrato de folhas de *Mouro alba*, são efetivos na cicatrização de feridas diabéticas, em virtude do potencial cicatrizante desse flavonóide.

A luteolina, por sua vez, pertence à classe das flavonas, sendo encontrada naturalmente em plantas medicinais, frutas e vegetais, e, devido a presença de hidroxila e de duplas ligações de carbono (2-3) em sua molécula, apresentam diversas características biológicas, como ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, o que justifica seu uso como cicatrizante no tratamento de feridas (OZAY et al., 2018).

Lodhi e Singhai (2013) relatam que a luteolina é um potente antioxidante, sendo duas vezes mais forte que a vitamina E, apresentando também potencial terapêutico cicatrizante porque reduz a duração do processo inflamatório e promove resistência à infecções. Segundo os autores, a presença de luteolina no extrato *Martynia annua* garantiu a melhora da cicatrização por promover aumento significativo na taxa de contração da ferida e aumento também da epitelização.

Frigotto e Portella (2012) mostraram que a luteolina, presente no *Achyrocline satureoides* (Lam.) Dc é o composto responsável pelo efeito anti-inflamatório da espécie. De igual maneira, Coutinho, Muzitano e Costa (2009) relatam que as folhas de *B. pinnatum* apresentam potencial anti-inflamatório em virtude da presença de flavonóides, entre eles, a luteolina. Chibli (2013), em análise semelhante ao presente trabalho, encontrou luteolina no extrato de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, a qual responde pelo efeito anti-inflamatório da espécie.

Lodhi e Singhai (2013) ao analisarem apigenina e luteolina em extrato de *Martynia annua* Linn relataram que ambos aumentam a produção de fibras colágenas e de fibroblastos amadurecidos, bem como melhoram a angiogênese, características que o fazem ser eficazes em promover melhora na cicatrização de feridas cutâneas.

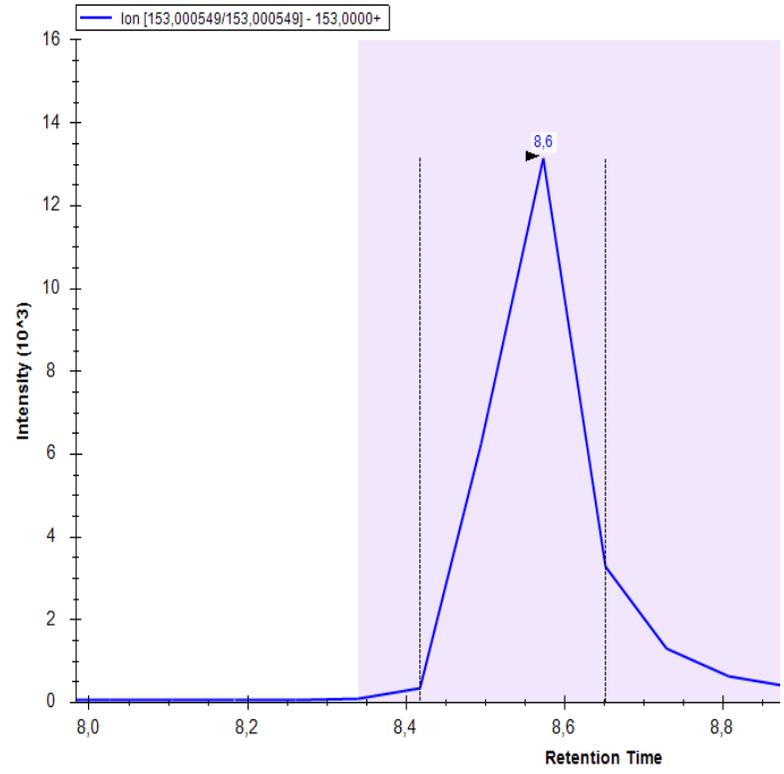
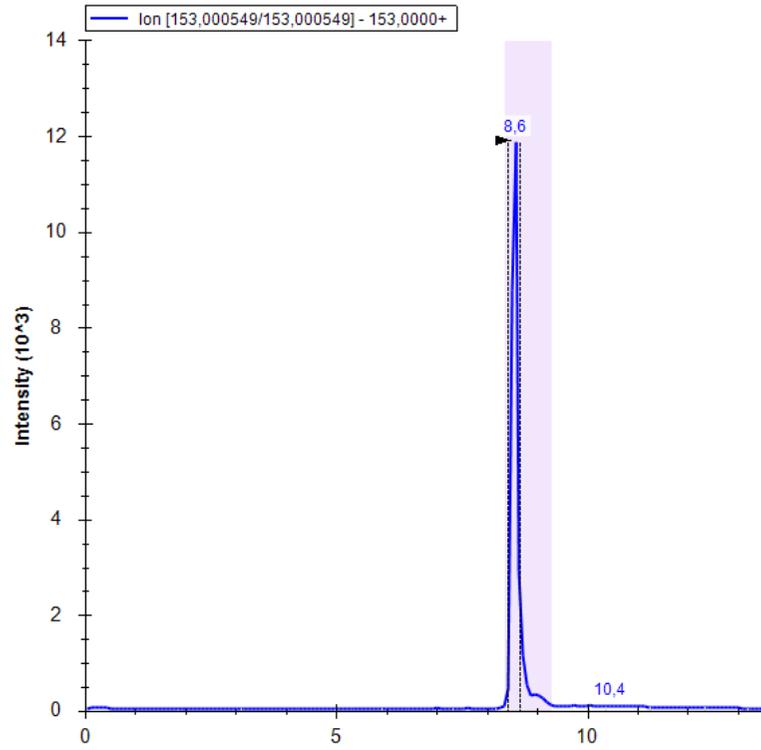


Figura 15 – Apigenina.

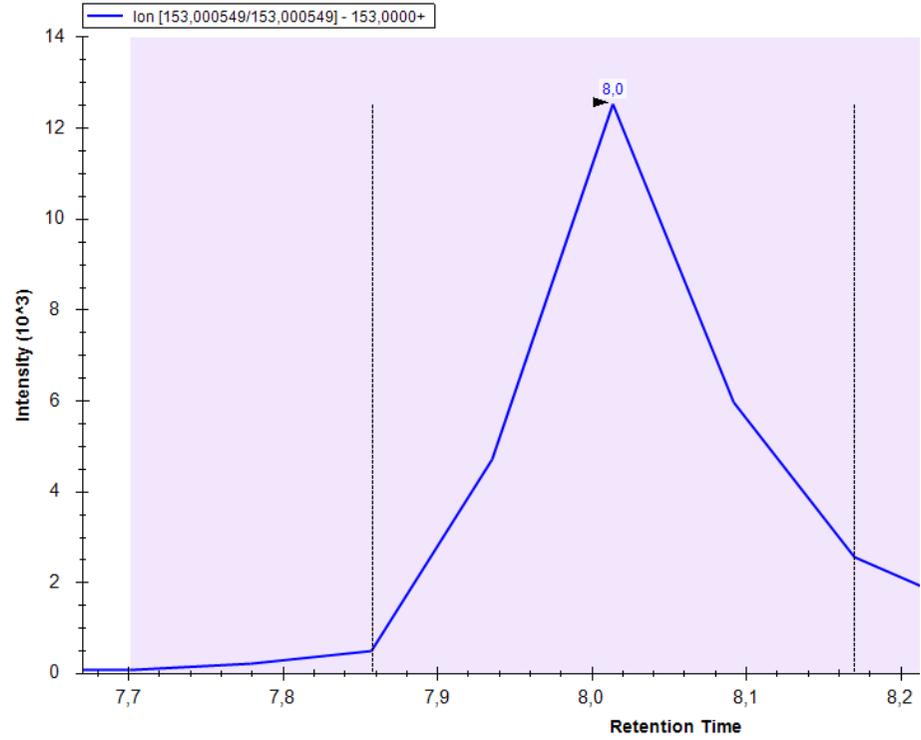
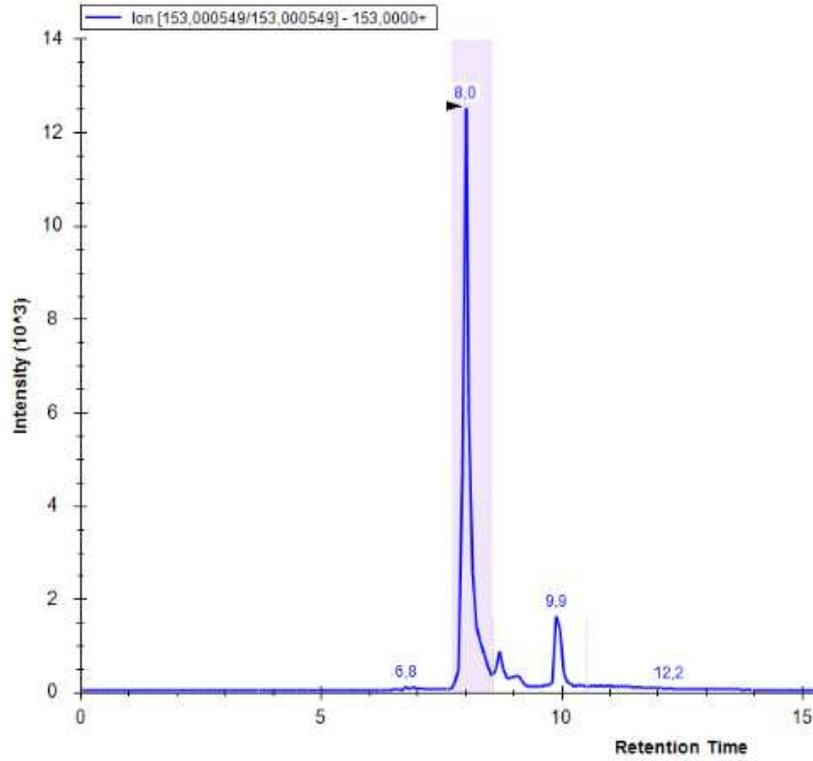


Figura 16 – Luteolina.

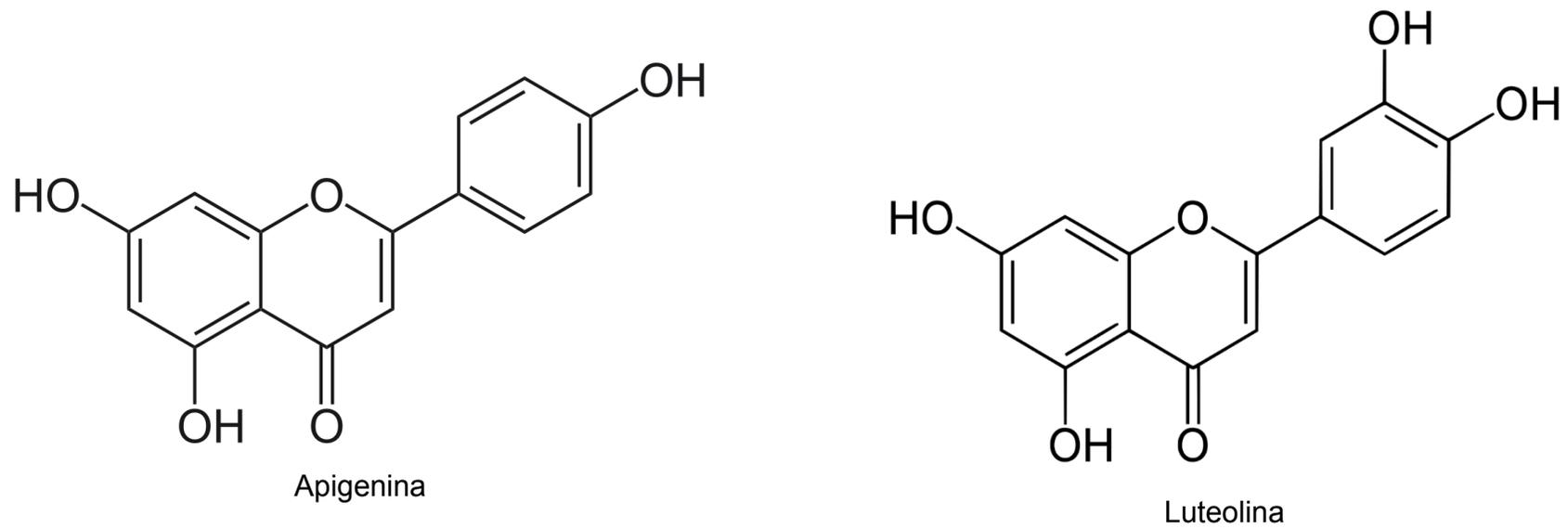


Figura 17 – Estrutura dos flavonóides Apigenina e Luteolina.

6.5 Análises dos Resultados de Feridas Tratadas com Extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip

6.5.1 Avaliação Clínica dos Animais e Feridas

O tempo experimental escolhido para este estudo foi de 21 dias, ao longo dos quais realizou-se três coletas das amostras, nos tempos 7º, 14º e 21º dias. Segundo Martins e colaboradores (2006) o período para melhor análise do processo de reparação do tecido compreende o terceiro e o vigésimo primeiro dia, sendo que após 21 dias a ferida cirúrgica já apresenta uma boa cicatrização, passível de comparação.

No período do estudo não houve sinais de desenvolvimento de infecção nas feridas e os parâmetros clínicos dos animais, como higidez, alerta e apetite se mostraram dentro da normalidade. Na figura 18 é possível observar o aspecto clínico macroscópico das feridas pós cirúrgicas nos dias zero, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro de pós-operatório. A partir do sétimo dia houve formação de crosta cicatriciais nas feridas de todos os grupos analisados, mas o grupo G4 (tratado com pomada veículo) apresentou crosta mais espessa ao longo dos dias analisados.

Segundo Gomes & Carvalho (2002) o surgimento de crosta sobre a ferida favorece a proliferação de microrganismos uma vez que reduz a migração de células epiteliais para a ferida, retardando a granulação do tecido e dificultando assim a sua cicatrização. Isso pode ser atribuído aos compostos triterpênicos que apresentam atividade antimicrobiana e em especial a friedelina ou friedelan-3-one que tem efeito na cicatrização, uma vez que age estimulando a angiogênese (CARMO et al., 2016).

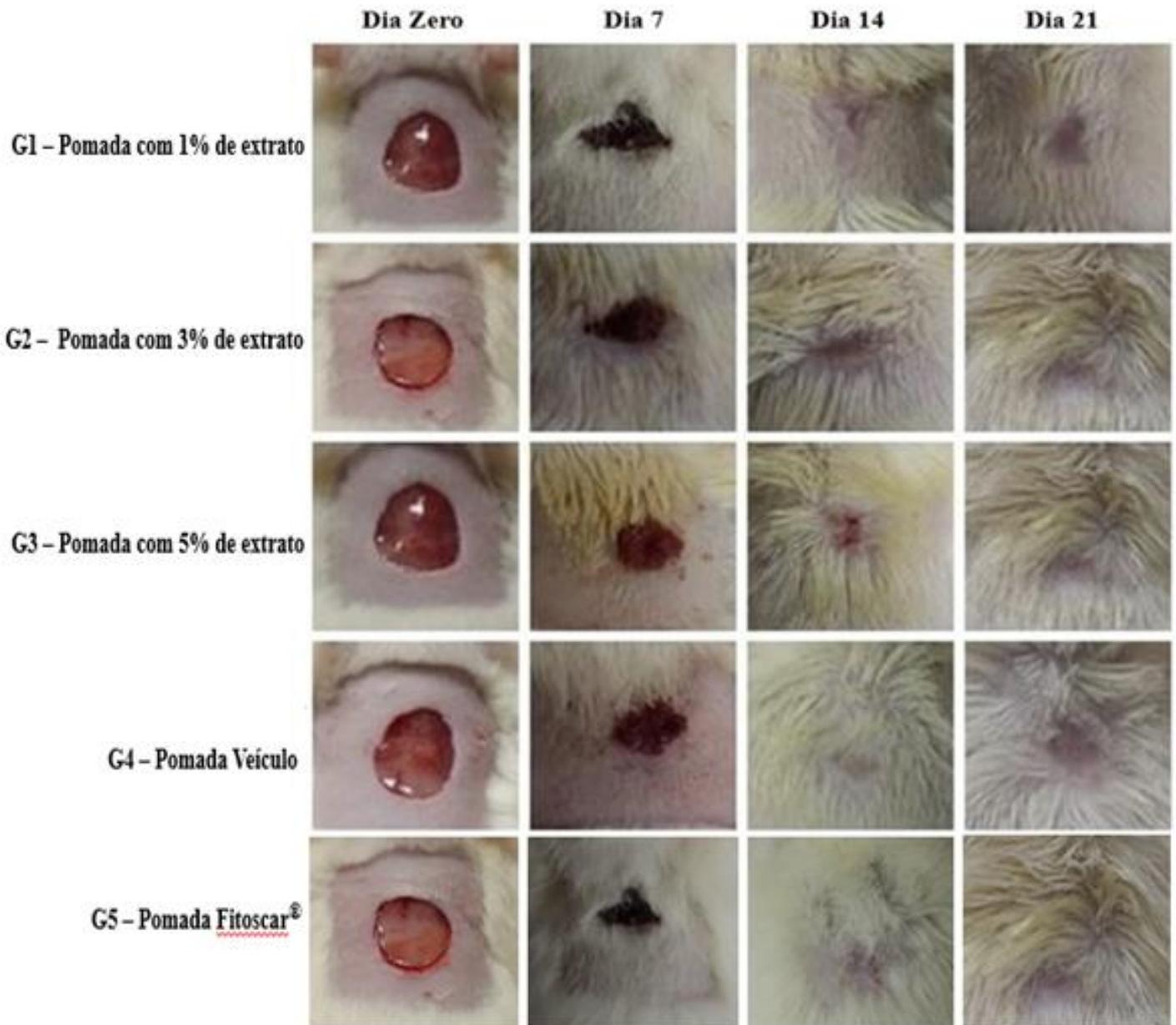


Figura 18 – Representação fotográfica da evolução macroscópica das feridas controles e experimental. Grupos tratados com a pomada contendo 1% (G1), 3% (G2) e 5% (G3) do extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip, com a pomada veículo (G4) e com pomada Fitoscar® (G5), nos dias zero, 07, 14 e 21 de pós operatório.

A tabela 5 apresenta os valores (em %) do índice de contração das feridas cirúrgicas produzidas nos animais que foram tratados com a pomada contendo o extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip nas concentrações 1%, 3% e 5%.

A contração da ferida se dá na fase proliferativa da cicatrização, em virtude da ação dos miofibroblastos, os quais sintetizam a matriz extracelular e produzem força mecânica para essa contração, por meio do estímulo de fatores de crescimento PDGF e TGF- β sobre tais células musculares (TOMASEK *et al.*, 2002). Nesse processo, a pele periférica à lesão e interligada por colágeno sofre a força de tração dos miofibroblastos e avança para o centro da lesão até que as bordas se encontrem (PAVLETIC, 2010). Dessa forma, o potencial de cicatrização pode ser mensurado pela contração da ferida, uma vez que quanto maior for a porcentagem de contração, melhor será a cicatrização (BRITO *et al.*, 2001).

Tabela 4 – Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das feridas dos grupos tratados com a pomada contendo 1% (G1), 3% (G2) e 5% (G3) do extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip, com a pomada veículo (G4) e com pomada Fitoscar® (G5), nos dias 07, 14 e 21 de pós operatório.

TRATAMENTO	DIA 07		DIA 14		DIA 21	
	Média	Σ	Média	Σ	Média	Σ
G1 – Ext 1%	27,02	12,08	73,65	23,4	79,45*	25,4
G2 – Ext 2%	16,12	9,91	72,55	18,9	76,05*	13,8
G3 – Ext 5%	16,65	12,66	74,8	21,1	74,7*	24,9
G4 – Veículo	33,5	15,2	77,45	24,6	51,8	16,5
G5 – FIT	17,9	15,45	70,5	42,9	53,45	19,9

Legenda: Dados do Índice de Contração de Ferida (%) expresso em média e desvio padrão (σ). As médias seguidas de asterisco (*) apresentam diferença significativa ($P < 0,05\%$) em relação ao tratamento G4 e G5, pelo Teste de Tukey.

No sétimo dia o grupo tratado com a pomada veículo (G4) apresentou o maior percentual de contração da ferida (33,5%), seguido do grupo G1, o qual apresentou 27,02% de contração, e do grupo G5, que apresentou 17,9% de contração. Já os grupos G2 e G3 tiveram o menor percentual de contração entre todos os grupos, com uma média de 16,12% e de 16,65%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos, no sétimo dia.

De maneira semelhante, no estudo de Santos *et al.* (2012) também foram encontradas diferenças no percentual de contração de feridas tratadas com mel e açúcar mascavo, de forma que nos primeiros dias o grupo tratado com açúcar mascavo apresentou menor redução do diâmetro da ferida quando comparado com o grupo tratado com mel e também com o grupo controle (solução salina 0,9%). Contudo, após o sétimo dia de tratamento o percentual de contração para esse grupo (açúcar mascavo) apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo controle, mantendo essa diferença até o final do tratamento.

No décimo quarto dia todos os grupos analisados apresentaram maior contração das feridas, sendo que os grupos G4 e G3 foram os que apresentaram maior contração, com 77,45% e 74,8%, respectivamente, seguidos do grupo G1, com 73,65%, e do grupo G2, com 72,55% de contração. Embora não tenham apresentado diferença estatística significativa ($P > 0,05\%$), todos tiveram porcentagens maiores que o grupo G5, o qual apresentou índice de contração de 70,5%.

Ao analisar as fases da cicatrização, durante a fase inflamatória (1º ao 7º dia) a pomada veículo (G4) se mostrou mais eficiente, com o maior percentual de redução da ferida, já na fase proliferativa (7º ao 14º dia) os grupos G1 e G3 também apresentaram aumento no percentual de contração, com resultados próximos ao da pomada veículo, mostrando-se também como eficazes na redução da área da ferida, embora sem apresentarem diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05\%$).

Achado semelhante foi descrito no estudo de Vieira (2015) em que o extrato de ingá nas concentrações 1% e 5% foi capaz de aumentar a contração da ferida na fase proliferativa da cicatrização, com 67,3% e 50,4% de redução, respectivamente, apresentando-se como tratamento mais eficiente que o grupo Fitoscar®, o qual apresentou apenas 24,09% de contração no período. A eficácia deste fitoterápico se deve às propriedades dos seus compostos bioativos, em especial, aos flavonóides, responsáveis por otimizar o processo cicatricial por agir como anti-inflamatório, antioxidantes e antimicrobiano (VIEIRA *et al.*, 2008).

O estudo de Eurides *et al.* (2011) também encontrou bom resultado ao 14º dia. Os autores analisaram o efeito cicatrizante do óleo de rosa mosqueta (*Rosa rubinosa affinis*) em camundongos machos em feridas pós cirúrgicas e observaram que a partir do 14º de pós operatório as feridas do grupo tratado com o óleo já estavam

aparentemente cicatrizadas, apresentando formação de tecido conjuntivo com maior intensidade e melhor organização das fibras colágenas e dos fibroblastos. Esses resultados indicam os constituintes do óleo de rosa mosqueta, em especial os ácidos graxos insaturados que atuam como anti-inflamatórios, ele apresenta promovem poder medicinal capaz de reduzir a inflamação e acelerar a cicatrização de feridas cutâneas (ORFILA; CASANOVA, 2017).

No vigésimo primeiro dia todos os grupos do presente estudo apresentaram bons percentuais de contração média, com G1 representando o melhor resultado, com percentual de 79,45%, seguido de G2 com 76,05% e G3 com 74,7%. Os três grupos apresentaram diferença significativa ($P \leq 0,05\%$) em relação aos grupos G4 e G5 respectivamente.

De maneira semelhante, no estudo de Marques *et al.* (2004) a avaliação do efeito cicatrizante do óleo de girassol mostrou que os grupos tratados com o óleo dessa semente ao 21º dia de ferida pós-operatória apresentaram diferença estatística significativa ($P \leq 0,05\%$) em relação ao grupo controle, com maior índice de contração das feridas, as quais já estavam quase totalmente cicatrizadas, ao contrário do grupo controle que ainda exibia pequenas áreas com tecido de granulação, necessitando de mais algum tempo para alcançar a cicatrização completa.

No estudo de Souza (2016) também foi avaliado a ação do extrato vegetal da espécie *Strycnos pseudoquina* sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos, e os grupos tratados com extratos concentrados (5% e 10%), ao final dos 21 dias da incisão cirúrgica, apresentaram maior índice de contração da ferida, com diferença significativa ($P \leq 0,05\%$) quando comparado ao grupo controle, mostrando-se mais eficazes no processo de cicatrização

6.5.2 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e Imunológicos

Além das propriedades físicas, químicas e farmacológicas de um fitoterápico, é importante considerar as características biológicas do indivíduo que irá receber esse composto a fim de avaliar o grau de segurança deste (VIEIRA, 2015). Nesse sentido, para avaliar o efeito da pomada contendo extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip no processo de cicatrização de feridas foi realizada a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos dos grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) de animais deste

estudo ao longo dos vinte e um dias após ferida cirúrgica. As figuras 19 a 24 representam tais parâmetros, a saber: Creatinina e Ureia, Leucócitos Globais, TGO, TGP e ácido úrico.

As análises bioquímicas de creatinina, ureia e ácido úrico são importantes para avaliar se o tratamento proposto afetou a função renal dos animais, já a análise de TGO e TGP avalia se os animais tiveram sua função hepática afetada pelo tratamento. Os leucócitos globais, também conhecidos como glóbulos brancos, são células responsáveis pela defesa do organismo, e sua análise mostra se houve desenvolvimento de infecção ao longo do tratamento.

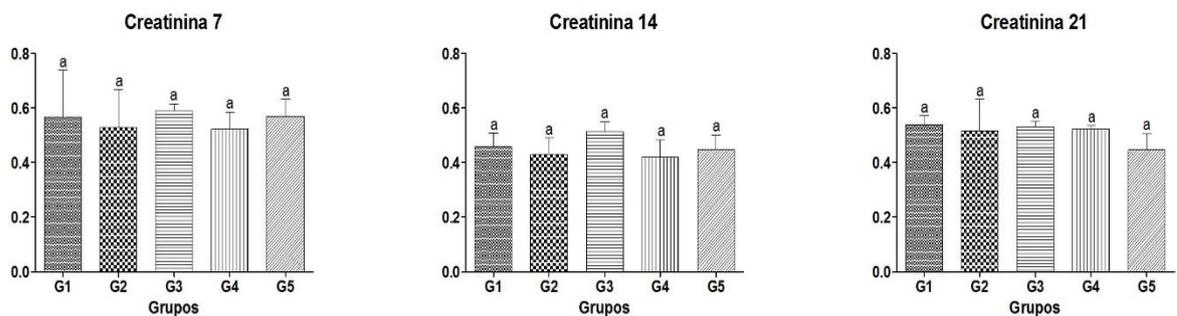


Figura 19 – Análise do teor de Creatinina (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.

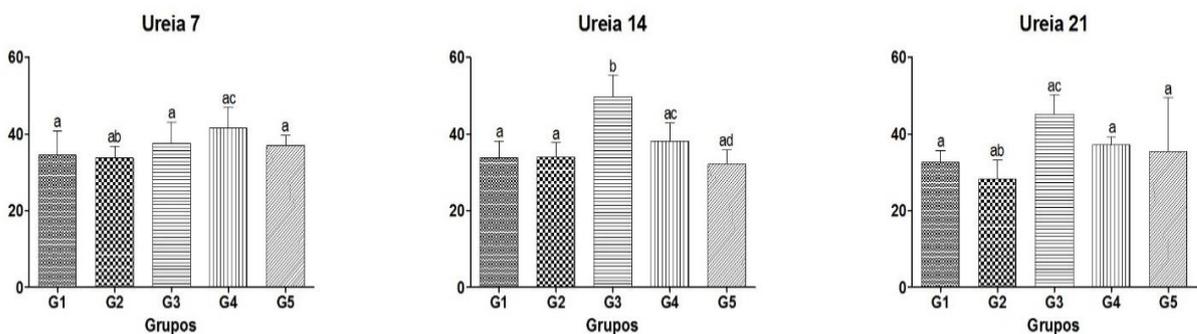


Figura 20 – Análise do teor de Ureia (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.

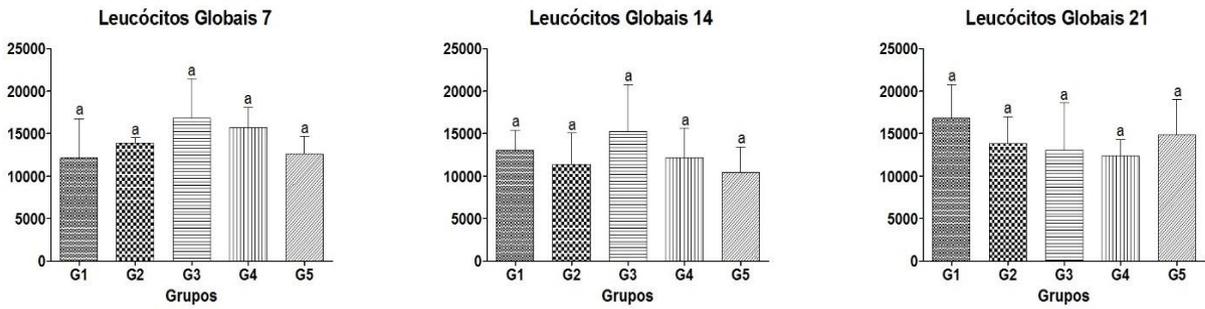


Figura 21 – Análise do teor de Leucóitos Globais (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.

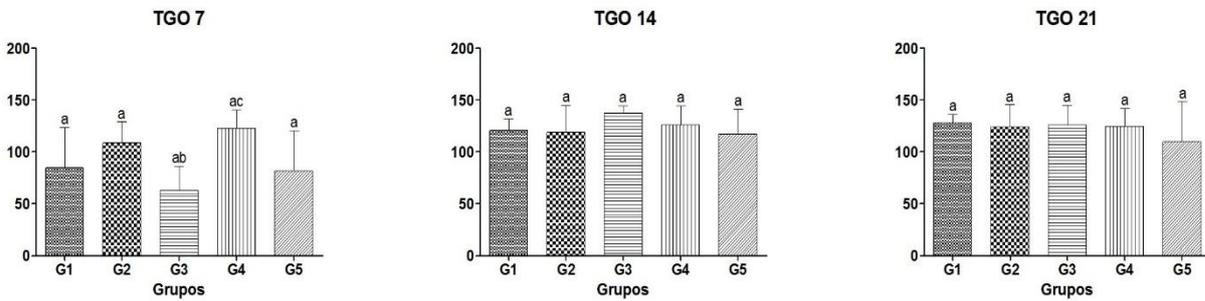


Figura 22 – Análise do teor de TGO (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.

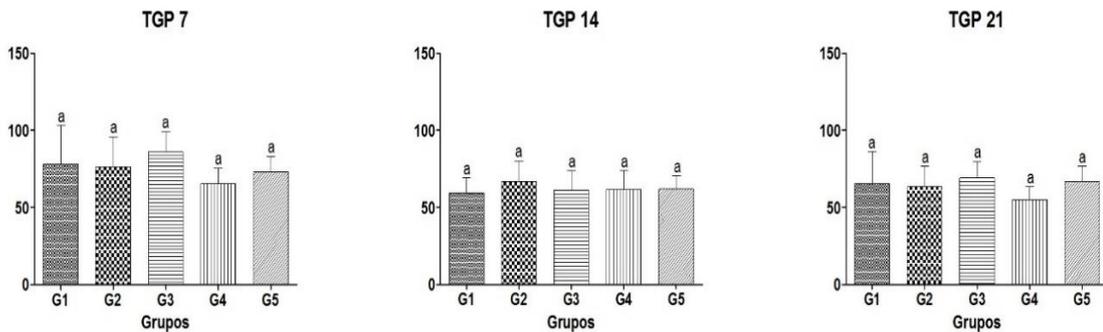


Figura 23 – Análise do teor de TGP (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.

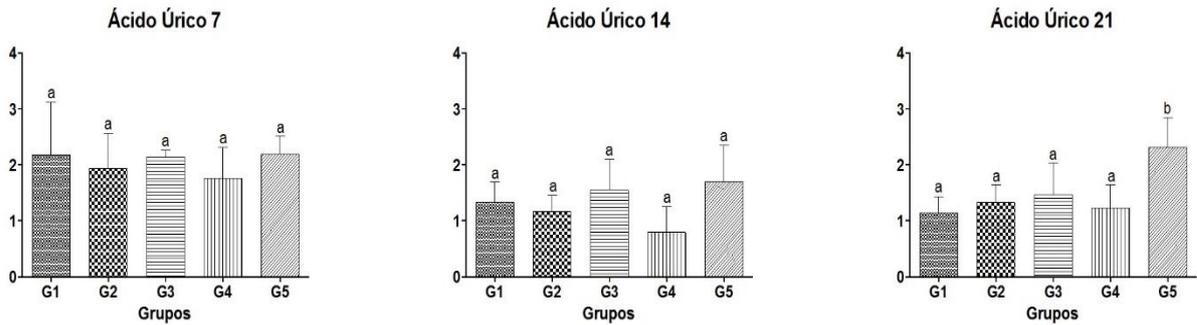


Figura 24 – Análise do teor de Ácido Úrico (mg/dl) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos dias sete, quatorze e vinte e um após a realização de ferida cirúrgica, respectivamente.

Embora se espere que os parâmetros bioquímicos de ratos de laboratórios sigam padrões semelhantes, alguns autores relatam que fatores como a dieta, o ambiente, a idade, o gênero, a linhagem, o genótipo, os fatores ecológicos e o estresse durante o tratamento afetam os valores hematológicos e bioquímicos e dessa forma, não é possível definir um valor de referência universal para tais parâmetros (NUNES *et al.*, 2004). Assim, é necessário que cada laboratório ou biotério estabeleça seus valores de referência com base em suas próprias condições e características dos animais utilizados (CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011).

O presente estudo utilizou como referência para esta análise os parâmetros definidos no estudo de Dantas *et al.* (2006). Assim, toda a análise bioquímica e imunológica realizada se mostrou dentro da normalidade para os quatro grupos estudados, e não houve variação clínica efetiva entre os valores desses marcadores renais, hepáticos e inflamatórios nos grupos tratados com o extrato, quando comparados com o grupo controle. Essa análise permite inferir que o tratamento com as pomadas contendo extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip não causou nenhuma alteração patológica nos animais, de forma que não promoveu desenvolvimento de infecção, haja visto os valores de leucócitos globais dentro da normalidade, e também não foi tóxico ao sistema renal e hepático, uma vez que os valores de ureia, creatinina, TGO e TGP também se mostraram satisfatórios, e não tóxicos quando comparados aos controles, sendo portanto, eficaz no tratamento de feridas cutâneas.

6.5.3 Avaliação da Imunoensaio para VEGF

Os macrófagos respondem pela produção de diversos mediadores que atuam na regulação do processo cicatricial, entre eles, o fator de crescimento vascular – VEGF – conhecido como o fator de permeabilidade vascular (SINGER; CLARK, 1999). O VEGF é uma importante proteína ligada à formação de novos vasos e essencial no processo inicial de cicatrização, sendo expresso no primeiro dia da lesão pelos queratinócitos e considerado uma das principais citocinas responsáveis por estimular o surgimento de tecido de granulação (DINH; BRAUNAGEL; ROSENBLUM, 2015).

Assim, a angiogênese é fundamental no processo de cicatrização, sendo importante para formar tecido de granulação provisório que irá renovar o estoque de oxigênio e nutrientes no novo tecido em crescimento, favorecendo a proliferação de fibroblastos que irão sintetizar o colágeno, necessário para organização tecidual e boa cicatrização (COLOMBO *et al.*, 2013).

Segundo Masi (2015), os fatores de crescimento, como o VEGF, aceleram a cicatrização, estimulam produção aumentada de novos vasos sanguíneos, aceleram a produção de tecido fibroso e atuam na maturação do colágeno, levando, por consequência, à cicatrização completa e madura de uma ferida.

Nesse sentido, existem técnicas de biologia molecular capazes de avaliar a expressão do VEGF, determinar a angiogênese e a formação de células endoteliais, sendo de extrema importância em estudos sobre cicatrizações cutâneas. Um dos meios de realizar essa avaliação é a Imunoistoquímica, a qual utiliza o princípio antígeno/anticorpo para detectar a expressão de proteínas em determinados tecidos (PINHO *et al.*, 2005).

O presente estudo avaliou a expressão do VEGF nos cinco grupos estudados (figura 25) e verificou que aqueles tratados com a pomada contendo o extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip apresentaram expressão aumentada desse fator de crescimento, contudo, apenas os grupos tratados com as pomadas nas concentrações 1% e 3% do extrato, G1 e G2 respectivamente, apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05\%$) quando comparados com o grupo controle (G4). Esses resultados indicam que as pomadas com os extratos vegetais nas concentrações 1% e 3% promovem maior vascularização nas feridas induzidas, acelerando assim o processo de cicatrização nesses grupos.

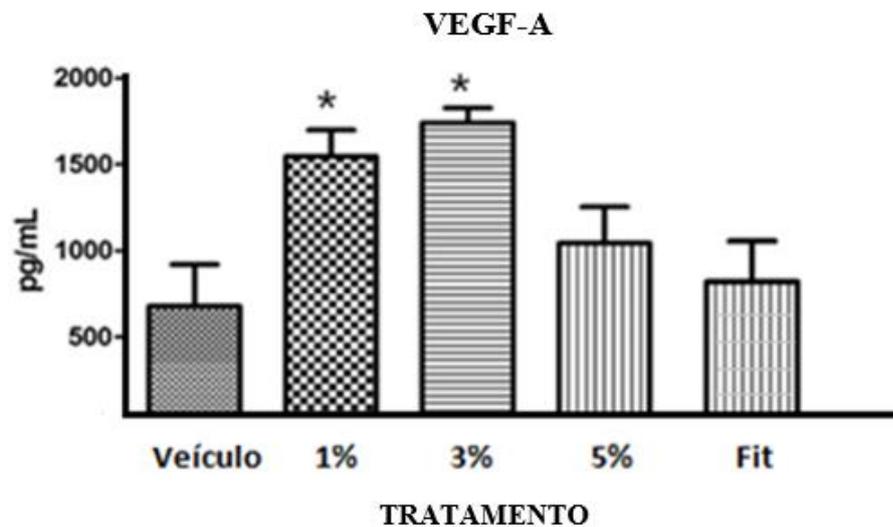


Figura 25 – Expressão imunoistoquímica do VEGF nas células teciduais de feridas tratadas com pomadas contendo o extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip nas concentrações 1% (G1), 3% (G2) e 5% (G3), com a pomada veículo (G4) e com a pomada Fitoscar® (G5). * Apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05\%$) quando comparados com o grupo controle positivo (pomada veículo) e controle negativo (pomada Fitoscar®).

Ao verificar o aumento dos níveis de VEGF nas feridas tratadas com a pomada e a conseqüente formação de vasos sanguíneos de forma intensa, pode-se compreender o potencial cicatrizante da pomada contendo o extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip, uma vez que, segundo Majewska & Gendaszewska-Darmach (2011), os fitoterápicos mais eficazes no tratamento de feridas apresentam potencial curativo em virtude de seus efeitos angiogênicos.

No trabalho de Marques (2016) foi avaliado o efeito do óleo de semente de maracujá no reparo de feridas cutâneas em ratos Wistar, sendo observado que o grupo tratado com o óleo apresentou resultado de VEGF significativamente maior que o grupo controle, indicando que o fitoterápico é eficiente no tratamento de feridas, uma vez que o aumento comprovado do endotélio vascular promove aceleração do processo cicatricial.

De maneira semelhante, no estudo de Santana (2015), que avaliou o efeito da solução de papaína no reparo tecidual em feridas de camundongos, observou-se que os grupos tratados com papaína (3%) apresentaram, após sete dias da ferida, níveis elevados de VEGF, o que, segunda a autora, promoveu redução do processo

inflamatório, facilitou a proliferação celular no leito da ferida, favoreceu a formação do tecido de granulação e a deposição de colágeno, indicando que o tratamento foi eficaz no reparo tecidual.

Ainda, o estudo de Estevão *et al.* (2015) avaliou o efeito do tratamento de feridas cutâneas de ratos com o óleo essencial de pimenta (*Schinus terebinthifolius Raddi*) sendo constatado que o tratamento com o óleo das folhas de pimenta à 5% foi bastante favorável na angiogênese e neovascularização, com maior liberação de fatores de crescimento (pró-angiogênicos) a partir do 14º dia de tratamento, os quais promoveram proliferação de capilares e organização de colágenos.

Em outro estudo foi avaliado o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) à 10% sobre feridas cutâneas de ratos e concluiu-se que o extrato foi capaz de aumentar a proliferação de vasos sanguíneos e neovascularização no leito das feridas dos animais tratados já no oitavo dia, mostrando uma angiogênese intensa promovida pelos mediadores da cicatrização. Segundo os autores, o extrato vegetal, em virtude de seus compostos bioativos, estimulou o processo angiogênico e promoveu reparo tecidual eficaz nos grupos tratados (ESTEVÃO *et al.*, 2013).

6.5.4 Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Colágeno tipo I e tipo III

A figura 26 representa fotomicrografias coradas com picrosírius dos colágenos tipo I e III das feridas tratadas com pomada contendo o extrato a 1% (G1), a 3% (G2), a 5% (G3), veículo (G4), e Fistocar G5, respectivamente, nos dias sete, quatorze e vinte e um de pós operatório.

É possível verificar a presença de colágeno tipo III (fibras imaturas – em verde) nas feridas em processo de cicatrização, o qual representa presença de tecido novo em formação, bem como a presença de colágeno tipo I (fibras maduras – em vermelho) no período analisado, indicando maturação do colágeno e a regeneração do tecido. Para analisar a maturação do colágeno é ideal que seja avaliado antes da cicatrização completa da ferida. A partir do sétimo dia da ferida a produção de fibroblastos atinge sua capacidade máxima, e, sendo essas as células que sintetizam o colágeno, pode-se observar presença aumentada de colágeno, e próximo ao período da oclusão total da ferida, verifica-se apenas colágeno do tipo I, uma vez que as fibras predominantes são as maduras (SILVA & PENNA, 2012; VIEIRA, 2015).

Na última etapa da cicatrização, conhecida como fase de remodelação, o tecido de granulação da ferida quase completamente cicatrizada tem sua matriz extracelular reorganizada, com presença abundante de vasos sanguíneos e fibras colágenas, que no início do processo eram do tipo III, e agora, ao final, são substituídas pelas fibras do tipo I, as quais são maduras e tornam o tecido mais forte, característico de uma cicatrização efetiva (SARANDY *et al.*, 2015).

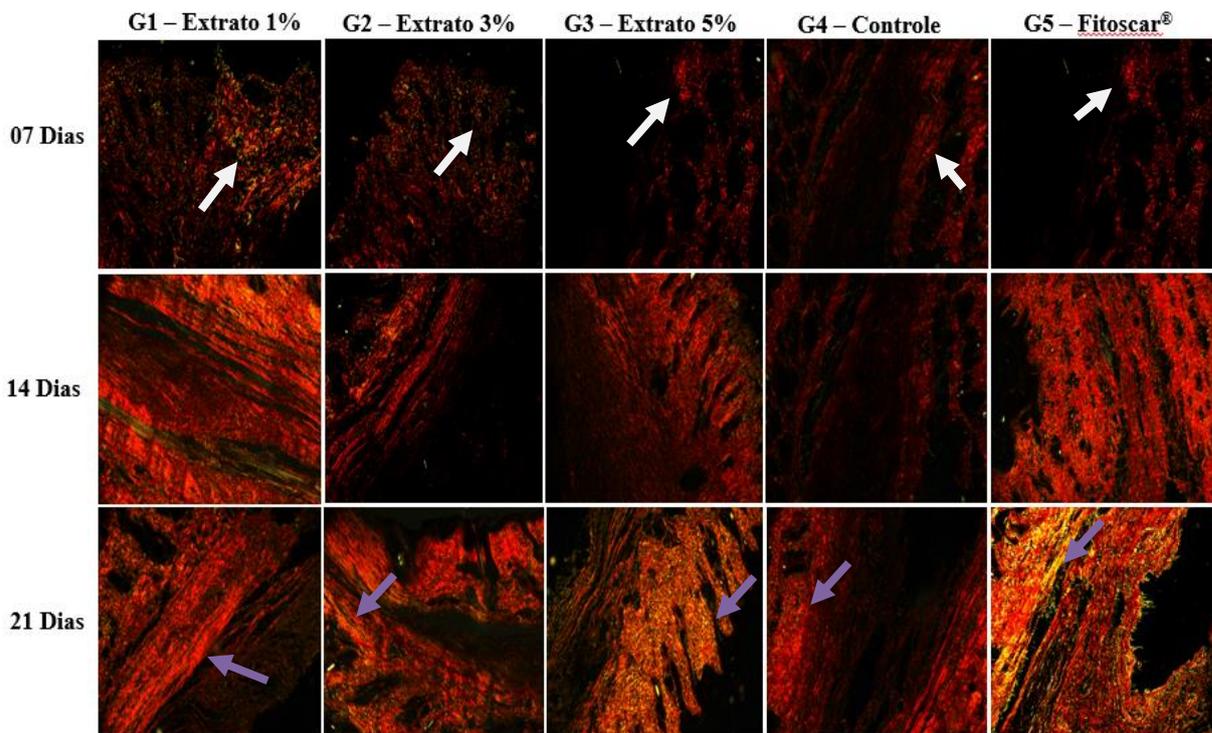


Figura 26 – Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com coloração Picrosirius e aumento de 400x, que mostra a distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) no tecido cicatricial da pele de ratos tratados com pomadas contendo extrato de *V. erythropappa* Schultz – Bip nas concentrações 1% (G1), 3% (G2), 5% (G3), pomada veículo (G4) e Pomada Fitoscar® (G5) nos dias sete, quatorze e vinte e um de pós operatório.

Ao analisar o resultado da polarização com coloração Picrosirius (figura 26) é possível verificar que os grupos tratados com as pomadas contendo o extrato (1%, 3% e 5%) tiveram no período inicial da análise a proliferação de colágeno tipo III – verde (regiões apontadas pelas setas brancas) e com 21 dias, no período final de quase completo fechamento da ferida, esses colágenos se transformaram em tipo I – vermelho (regiões apontadas pelas setas roxas), mostrando-se mais maduros, em relação ao grupo controle.

Foi realizada análise quantitativa dos colágenos tipo I e tipo III ao longo do período de tratamento e os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 6 e 7, que mostram a média (%), mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo de colágenos para cada grupo.

Tabela 5 – Quantitativo de colágeno tipo III (verde) nas feridas tratadas com as pomadas nos dias sete, quatorze e vinte um de pós-operatório

Tempo	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
7 Dias	Pomada com extrato 1% ^a	3,29	1,74	2,87	0,33	7,31
	Pomada com extrato 3% ^b	1,23	1,10	0,99	0,20	4,41
	Pomada com extrato 5% ^b	6,58	4,24	5,62	1,23	14,42
	Pomada Veículo (Controle) ^b	2,64	8,24	0,87	0,10	46,00
	Pomada Fitoscar® ^a	1,72	1,42	1,27	0,15	5,30
14 Dias	Pomada com extrato 1% ^a	5,31	2,32	4,89	1,39	9,26
	Pomada com extrato 3% ^b	2,44	2,00	2,00	0,30	8,42
	Pomada com extrato 5% ^b	10,72	7,13	9,23	0,88	32,11
	Pomada Veículo (Controle) ^b	7,48	6,89	5,61	0,31	25,22
	Pomada Fitoscar® ^a	7,71	6,47	6,05	0,37	25,20
21 Dias	Pomada com extrato 1% ^a	20,60	11,02	18,51	3,72	40,80
	Pomada com extrato 3% ^b	8,74	3,82	8,95	1,07	15,02
	Pomada com extrato 5% ^b	10,47	3,26	10,11	5,13	16,61
	Pomada Veículo (Controle) ^b	33,69	8,46	31,55	21,64	49,99
	Pomada Fitoscar® ^a	32,91	7,73	32,65	20,10	47,20

^a Dados com distribuição paramétrica^b Dados com distribuição não paramétrica

Tabela 6 – Quantitativo de colágeno tipo I (vermelho) nas feridas tratadas com as pomadas nos dias sete, quatorze e vinte um de pós-operatório.

Tempo	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
7 Dias	Pomada com extrato 1% ^a	6,38	3,50	5,55	1,26	14,11
	Pomada com extrato 3% ^a	3,38	2,39	2,90	0,22	8,25
	Pomada com extrato 5% ^a	20,89	6,73	21,93	10,46	33,56
	Pomada Veículo (Controle) ^a	11,54	5,25	12,28	2,21	22,20
	Pomada Fitoscar® ^a	13,19	6,16	14,10	3,40	25,20
14 Dias	Pomada com extrato 1% ^a	19,35	4,89	19,46	10,66	27,50
	Pomada com extrato 3% ^a	14,29	5,87	14,33	3,86	27,70
	Pomada com extrato 5% ^a	42,87	11,24	44,80	22,70	64,60
	Pomada Veículo (Controle) ^a	32,98	5,44	32,52	18,50	44,20
	Pomada Fitoscar® ^a	36,63	5,20	35,05	22,10	45,30
21 Dias	Pomada com extrato 1% ^a	53,86	6,65	53,71	42,59	71,75
	Pomada com extrato 3% ^a	23,56	5,35	23,96	13,82	35,09
	Pomada com extrato 5% ^b	61,33	8,53	65,18	29,29	70,10
	Pomada Veículo (Controle) ^a	35,27	7,61	34,61	20,95	49,59
	Pomada Fitoscar® ^a	38,36	6,21	39,65	21,22	48,90

^a Dados com distribuição paramétrica

^b Dados com distribuição não paramétrica

Nas figuras 27 a 32 a seguir constam a representação gráfica dos percentuais de colágenos tipo I e tipo III encontrados nas feridas tratadas com as pomadas nos dias sete, quatorze e vinte um de pós-operatório.

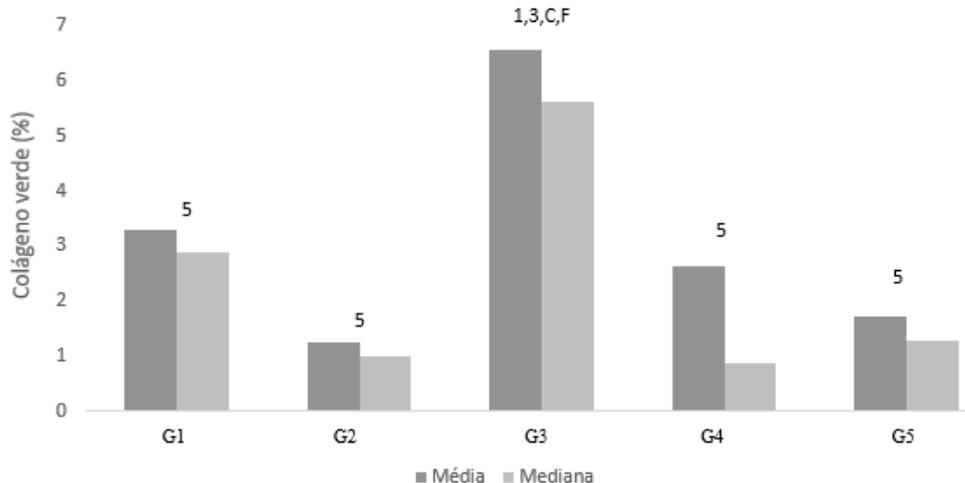


Figura 27 – Percentual de colágeno tipo III (verde) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no sétimo dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).

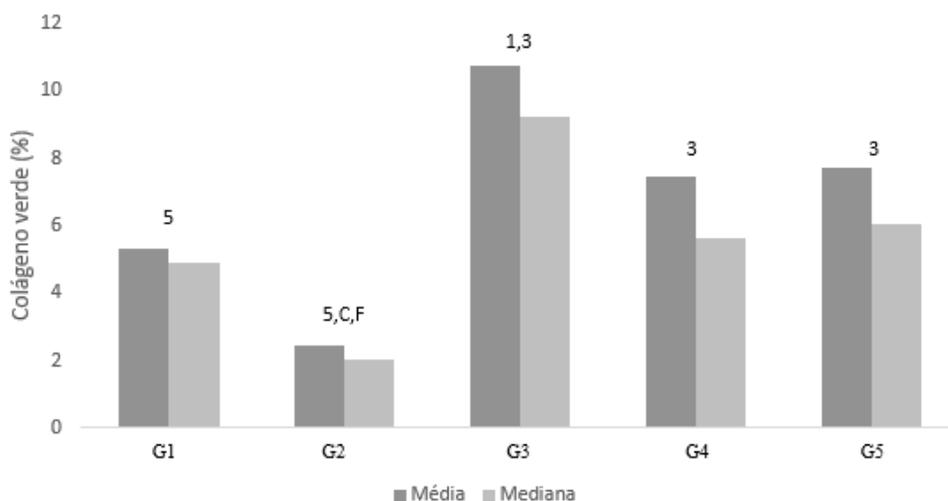


Figura 28 – Percentual de colágeno tipo III (verde) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no décimo quarto dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).

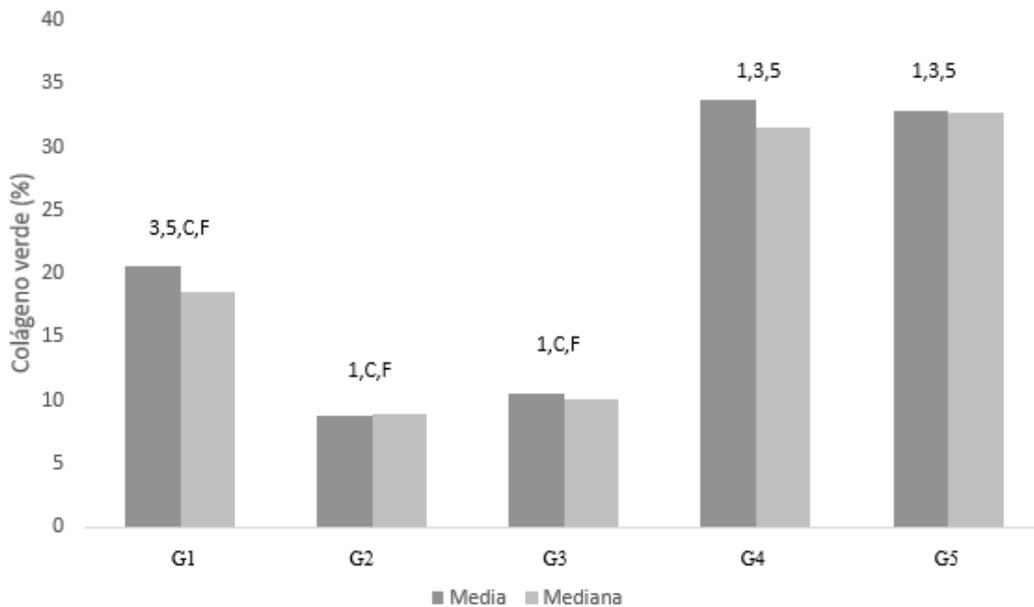


Figura 29 – Percentual de colágeno tipo III (verde) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no vigésimo primeiro dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).

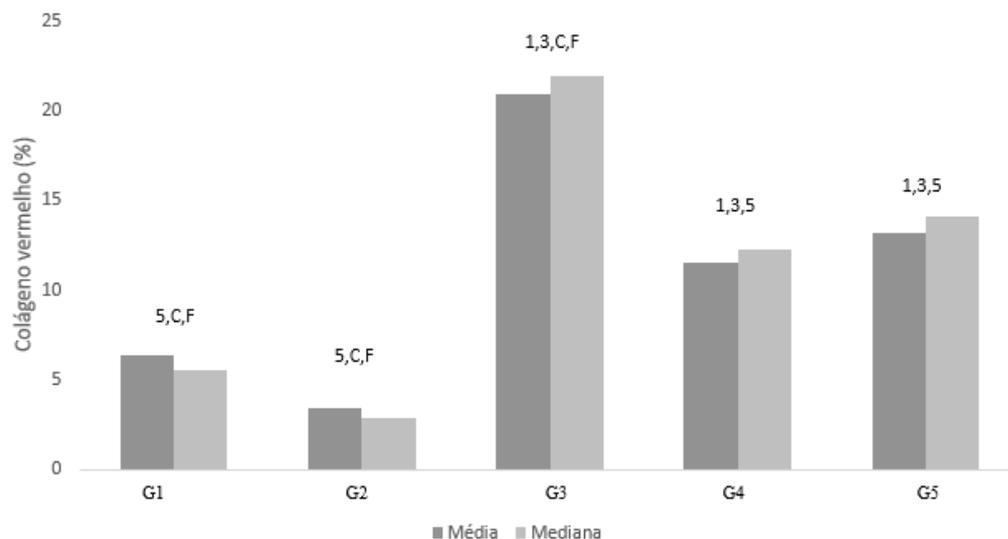


Figura 30 – Percentual de colágeno tipo I (vermelho) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no sétimo dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).

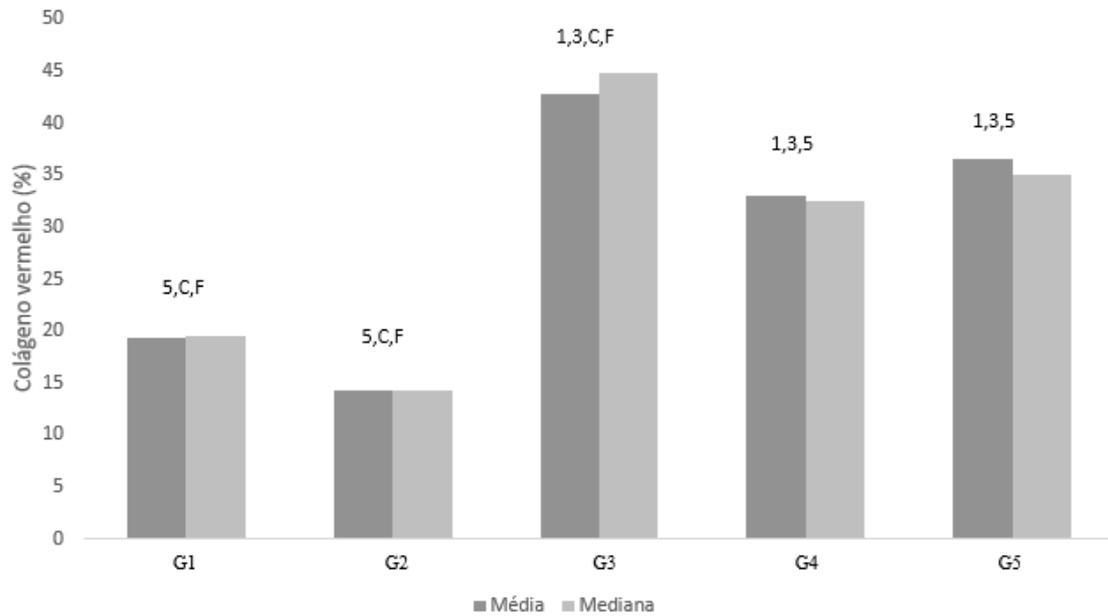


Figura 31 – Percentual de colágeno tipo I (vermelho) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no décimo quarto dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).

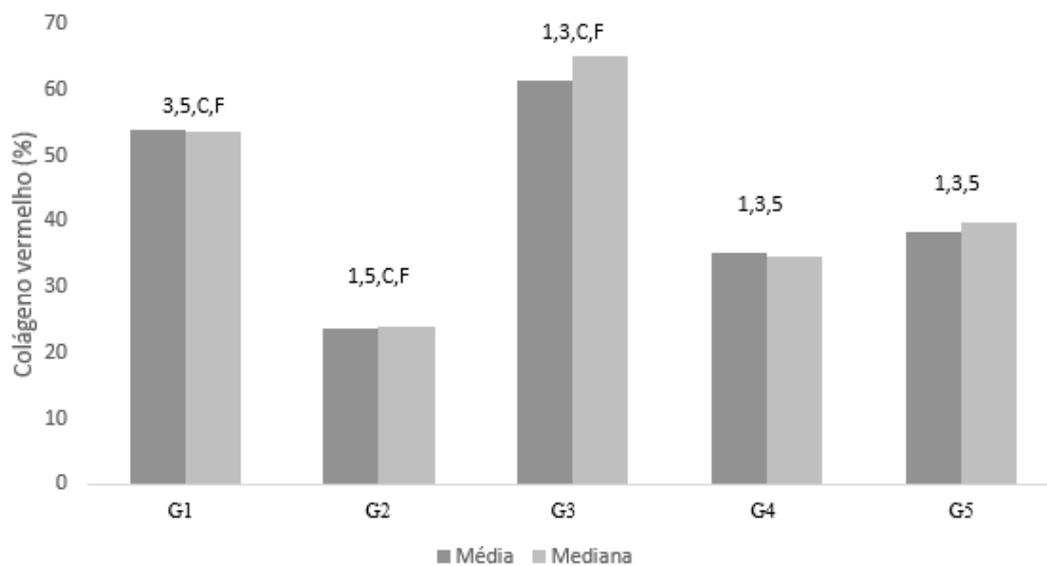


Figura 32 – Percentual de colágeno tipo I (vermelho) encontrado nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, no vigésimo primeiro dia de tratamento. 1 representa diferença significativa em relação ao grupo G1 (1%), 3 representa diferença significativa em relação ao grupo G2 (3%), 5 representa diferença significativa em relação ao grupo G3 (5%), C representa diferença significativa em relação ao grupo G4 (Veículo), F representa diferença significativa em relação ao grupo G5 (Fitoscar®).

A análise do colágeno tipo III (verde) mostrou que no sétimo dia de pós-operatório o grupo G3 (pomada 5%) apresentou maior quantidade dessas fibras colágenas (6,58%), mostrando diferença significativa com relação a todos os outros grupos – G1 (3,29%), G2 (1,23%), G4 (2,64%) e G5 (1,72%). No décimo quarto dia de pós-operatório o grupo G3 também apresentou maior quantidade dessas fibras (10,72%), mas com diferença significativa apenas quando comparado com os grupos G1 (5,31%) e G2 (2,44%). Já, no vigésimo primeiro dia de pós-operatório o grupo G1 (pomada 1%) apresentou maior percentual de fibras (20,60%) do tipo III, quando comparado com os grupos G2 (8,74%) e G3 (10,47%), mas foi menor, quando comparado com os grupos G4 (33,69%) e G5 (32,91%). A pomada contendo 3% de extrato (G2) foi a que apresentou menor percentual de fibras do tipo III em todos os dias de tratamento. Ao sétimo dia a pomada contendo 5% de extrato (G5) foi a que apresentou maior percentual de colágenos tipo III e ao final dos 21 dias, os grupos que apresentaram maior percentual desse tipo de fibra foram os grupos controle (G4) e Fitoscar® (G5).

Quanto a análise do colágeno tipo I (vermelho), ao sétimo dia de pós-operatório o grupo G3 apresentou maior quantidade (20,89%) dessas fibras, mostrando diferença significativa quando comparado com todos os outros grupos – G1 (6,38%), G2 (3,38%), G4 (11,54%) e G5(13,19%), contudo, os grupos controle (G4) e Fitoscar® (G5) apresentaram maior percentual que os grupos G1 e G2, com diferença significativa entre eles. Ao décimo quarto dia de pós-operatório essa relação se manteve, com G3 apresentando maior percentual (42,87%) que todos os outros grupos e G4 e G5 (32,98 e 36,63, respectivamente) sendo maior que G1 e G2 (19,35% e 14,29%, respectivamente). Já, ao vigésimo primeiro dia o G3 continua apresentando maior percentual (61,33%) dessas fibras, o G1 agora tem percentual maior (53,86%) que G4 e G5 (35,27% e 38,36%, respectivamente) e o G2 (23,56%) é o que apresenta o menor percentual dessas fibras, com diferença significativa para todas essas associações.

Diante desses resultados, conclui-se que a pomada contendo 3% de extrato se mostrou pouco efetiva para o processo de cicatrização da ferida, uma vez que a produção de colágeno, necessário ao processo, foi deficiente no leito das feridas tratadas por ela.

Ao comparar a análise dos dois tipos de colágeno, verde e vermelho, observa-se que ao final do tratamento os grupos controle (G4) e Fitoscar® (G5) tiveram maior quantidade de fibras do tipo III, consideradas imaturas, e os grupos tratados com as pomadas contendo extrato 1% e 5% (G1 e G3, respectivamente) tiveram maior quantidade de fibras do tipo I, consideradas maduras, indicando que tais formulações foram efetivas para a cicatrização das feridas, com G3 apresentando o melhor resultado.

De maneira geral, essa análise indicou que a pomada foi eficaz em promover inicialmente formação de novo tecido sobre o leito da ferida (colágeno III - verde), o qual passou por maturação (colágeno I - vermelho), tornando o tecido cicatricial mais forte e resistente.

Estudos semelhantes com outros extratos também encontraram esses resultados. Neto (2011) ao analisar o efeito cicatrizante do extrato de frutos de *Genipa americana L* em feridas de ratos verificou que os extratos promoveram melhor organização das fibras de colágeno tipo I ao final de 21 dias, promovendo melhor elasticidade da pele e melhor cicatrização.

Em outro estudo, Souza (2016) verificou a ação do extrato de *Strycnos pseudoquina* nas concentrações 5% e 10% no reparo de feridas cutâneas de ratos diabéticos e os resultados da análise de colágeno sob microscopia de polarização mostrou que ambas as concentrações foram eficazes no aumento de colágeno tipo I ao final de 21 dias, com maior taxa de fechamento das feridas do que o grupo controle.

No estudo de Santana (2015) também foi avaliado o crescimento de fibras colágenas em feridas intencionais de grupos de camundongos tratados com gel de papaína 3%, sendo observado que as fibras colágenas desse grupo apresentaram ao final de 21 dias melhor organização, quando comparadas ao grupo controle, sendo predominante a presença de colágeno tipo I. Segundo a autora, essa predominância do colágeno tipo I no final do período analisado indica aumento da contração da ferida e melhor cicatrização em menor tempo.

Ainda, no estudo de Vieira (2015) foi avaliado o efeito cicatrizante do extrato de angico 1% e 5% sobre feridas cutâneas de coelhos e a análise das fibras colágenas revelou que o extrato nessas concentrações foi eficaz já em 14 dias de tratamento, promovendo alta concentração de colágeno tipo I, quando comparado ao grupo controle, o que causou uma média de 80% de contração da ferida, indicando o efeito do extrato sobre a maturação do colágeno e melhor cicatrização.

É importante notar que a eficiente ação cicatrizante dos fitoterápicos é atribuída principalmente à presença de flavonoides, um dos grupos fenólicos mais importantes oriundos do metabolismo secundário das plantas (SIMÕES *et al.*, 2016) e encontrado na análise fitoquímica deste trabalho, bem como, em outros estudos (SOUSA *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 2003; SOARES & FABRI, 2011) que analisaram a mesma espécie vegetal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados alcançados neste estudo conclui-se das análises dos extratos brutos – etanólico e hexânico – de *V. erythropappa* Schultz – Bip, que o extrato hexânico foi o que se mostrou eficiente para a proliferação de fibroblastos cultivados *in vitro*, sendo assim, definiu-se por utilizá-lo na formulação das pomadas a serem aplicadas como tratamento das feridas.

A análise deste extrato – hexânico – por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas mostrou que é composto por substâncias apolares, como o lupenol e a lupenona. Já, a análise por cromatografia líquida mostrou que é composto por dois principais flavonóides: Apigenina e Luteolina. Esses compostos encontrados no extrato dão a ele importante caráter antioxidante e cicatrizante. Esses efeitos puderam ser observados nas análises das feridas, nas quais as pomadas contendo o extrato hexânico de *V. erythropappa* Schultz – Bip (1%, 3% e 5%) promoveram cicatrização da ferida, mostrando ser eficaz na fase proliferativa da cicatrização, resultando em melhor índice de contração da ferida.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos e imunológicos mostrou que as pomadas contendo o extrato, para todas as três concentrações testadas, não causaram nenhuma alteração patológica nos animais, de forma que não promoveram desenvolvimento de infecção, haja visto os valores de leucócitos globais dentro da normalidade, e também não foram tóxicas ao sistema renal e hepático, uma vez que os valores de ureia, creatinina, TGO e TGP também se mostraram dentro dos valores de referência utilizados.

Os parâmetros imunistoquímicos indicaram que as pomadas contendo o extrato hexânico modulou o processo inflamatório, uma vez que promoveu maior vascularização nas feridas induzidas, acelerando assim o processo de cicatrização;

As pomadas contendo o extrato hexânico apresentaram resposta mais efetiva ao tratamento, quando comparadas com o fitoterápico (Pomada Fitoscar), o que indica a possibilidade do uso dessa planta como cicatrizante no tratamento de feridas, chamando atenção para seu possível uso como medicamento fitoterápico. Mediante esses resultados, reitera-se a necessidade de estudos futuros voltados para a análise de formulações com maiores concentrações desse extrato e sua aplicação por período superior há 21 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, G. L. **Estudo de formulações de fitoderivados e flavonoide na inflamação e cicatrização de feridas em coelhos.** {Tese} Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa; Viçosa, 2019. 134p.

ARIAS, T. D. **Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso.** Washington: organización Panamericana de La Salud/Organización Mundial de La Salud, 1999.

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.**, v.52, n.3, p.407-422, 1991.

ASONGALEM, E. A. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.301-308, 2004.

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Arch Dermatol Res.**, v. 306, n. 7, p. 601-617, 2014.

BARBOSA, M. O. et al. A prática da medicina tradicional no Brasil: um resgate históricos dos tempos coloniais. **Caçador**, v.15, n.1, p.65-77, 2016.

BEHEREGARAY, W. K. et al. Eletroestimulação na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos. **Cienc. Rural.**, v.44, n.5, p.878-883, 2014.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.1, p.3-4, 2005.

BESERRA, F. P. **Mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante de feridas cutâneas do lupeol isolado das cascas do caule de *Bowdichia virgilioides* Kunth.**

(Fabaceae) em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. {Tese} Doutorado em Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal. UNESP; Botucatu, 2019.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Curr Opin Microbiol.**, v.13, n.1, p.528-534, 1992.

BLANES, L. Tratamento de feridas. BAPTISTA-SILVA, J. C. C. (Org.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado.** 1º Ed. São Paulo: 2004. 87p.

BOEING, T. **Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae).** {Dissertação} Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí; Itajaí, 2015. 113p.

BORGES, E. L. et al. **Feridas: Como Tratar.** 2º Ed. Belo Horizonte/MG: Coopmed, 2007.

BOTTONI, A. et al. Papel da nutrição na cicatrização. **Revista Ciências da Saúde,** v.1, n.1, p.98-103, 2011.

BRASIL, Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados.** Brasília, 2012. 1v. 62p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares** no SUS-PNPIC-SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC N° 10 de 09 de março de 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basic of wound healing in diabetes. **J. Clin Invest**, v.117, n.5, p.1219-22, 2007.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. 1º Ed. São Paulo: Santos, 2010. 416 p.

BRITO, N. M. B. et al. Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas, em ratos, tratadas com óleo de andiroba. **Rev. Para. Med.**, v.15, n.2, p.17-22, 2001.

BRODERICK, N. Understanding chronic wound healing. **The Nurse Practitioner**, v.34, n.10, p.17-22, 2009.

CANDIDO, L. C. **Feridólogo: tratamento clínico-cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas**. 1º Ed. São Paulo, 2006. 646p.

CARMO, J. O. S. et al. Uso tópico da friedelina acelera a cicatrização de feridas em animais diabéticos, através da modulação do processo de angiogênese. Resumo 68ª Reunião Anual da SBPC, 2016. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/68ra/resumos/resumos/2238_17281f622c657e485ca662c15a78a4c71.pdf> Acesso em 10 de Julho de 2019.

CASTELLO BRANCO, A. C. S. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.15, n.2, p.209-214, 2011.

CASTRO, P. R. **Cinética da angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja na musculatura abdominal em camundongos**. (Dissertação) Mestrado em

Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, 2012. 115p.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chemistry**, v.90, n.1-2, p.17-21, 2005.

CHIBLI, L. A. **Caracterização química e atividades biológicas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken.** {Dissertação} Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora; Juiz de Fora, 2013. 161p.

COELHO, P. L. C. **Avaliação da ação antitumoral e imunomodulatória do flavonoide apigenina, extraído de *Croton Betulaster Mull*, em células de glioma.** {Dissertação} Mestrado em Imunologia. Universidade Federal da Bahia; Bahia, 2013. 72p.

COLOMBO, F. et al. Effect of low-level laser therapy ($\lambda 660\text{nm}$) on angiogenesis in wound healing: a Immunohistochemical Study in a rodent model. **Braz. Dent. J.**, v.24, n.4, p.308-312, 2013.

COLTRO, O. S. et al. Atuação da cirurgia plástica no tratamento de feridas complexas. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.38, n.6, p.381-6, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZINATO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.**, v.28, n.2, p.165-170, 2006.

DEALEY, C. **Cuidando de Feridas: Um Guia Para Enfermeiras.** 1º Ed. São Paulo: Atheuneu, 2001. 248p.

DELVING, L. K. O. B. **Avaliação dos potenciais citotóxicos e anti-inflamatório dos extratos etanólico e hexânico da *Calyptanthes grandifolia* O. Berge em cultura celular.** (Dissertação) Mestrado em Biotecnologia. Centro Universitário UNIVATES; Lajeado, 2015. 86p.

DINH, T.; BRAUNAGEL, S.; ROSENBLUM, B. I. Growth Factors in Wound Healing: The Present and the Future? **Clin Podiatri Med Surg.**, v. 32, n. 1, p. 109-119, 2015.

DUTRA, R. C. et al. Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleisch, Asteraceae. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.20, n.6, p.818-824, 2010.

EBERHERDT, T. D. et al. Mensuração de feridas: revisão da literatura. **Ciência & Saúde**, v.8, n.2, p.79-84, 2015.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **Afr. J. Biotechnol.**, v.4, n.7, p.685-688, 2005.

ESTEVIÃO, L. R. M. et al. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius Raddi*). **Acta Cir. Bras.**, v.30, n.4, p.289-295, 2015.

ESTEVIÃO, L. R. M. et al. Effects of the topical administrations of copaíba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. **Act Cir. Bras.**, v.28, n.12, p.863-869, 2013.

ETHRIDGE, R. T.; LEONG, M.; PHILLIPS, M. T. Cicatrização de feridas. In: TOWNSED, C. M. et al. (Org.). **Tratado de Cirurgia**. Rio de Janeiro; Elsever, 2010. 2240p.

EURIDES, D. et al. Efecto del extracto de óleo de rosa mosqueda (*Rosa aff. Rubiginosa*) em la cicatrización de heridas cutáneas. **Rev. Electr Vet.**, v.12, n.1, p.1-10, 2011.

FABRI, R. L. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **J. Med. Food**, v.14, n.1, p.1-7, 2011.

FAHIE, M. A.; SHETTKO, D. Evidence-based wound management: a systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelization. **Vet. Clin. North Am Small Anim Pract.**, v.37, n.3, p.559-577, 2007.

FERREIRA, M. C. et al. Complex wounds. **Clinics**, v.61, n.6, p.571-8, 2006.

FERNANDES JUNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Cien. Rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

FIGUEIREDO, S. A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasilienses*.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2013. 101p.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividade biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa: Porto, 2013. 43p.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Br J Nutr.**, v.88, n.6, p. 587-605, 2002.

FRIGOTTO, D. F.; PORTELLA, M. R. A experiência de idosos de três descendências étnicas sobre o uso de plantas medicinais no cuidado em saúde. **RBCEH**, Passo Fundo, v.9, n.1, p.33-46, 2012.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GODOY, J. M. P.; PRADO, P. A. Ácidos gordos essenciais enriquecidos com vitamina A, E e ácido linoléico como pensos em feridas crônicas. **Rev. Port. Clin. Geral**, v.21, n.2, p.193-5, 2005.

GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V. Tratamento de Ferida: Revisão da Literatura. **Rev. Min. Enf.**, v.6, n.1, p.67-72, 2002.

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.6, n.1, p.8-14, 2003.

GONÇALVES, R. V. et al. Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of *Brassica oleracea* on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. **Pathol Res Pract.**, v.209, n.10, p.648-543, 2013.

GRIZZI, F. et al. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC Cancer**, v.5, n.14, 2005.

HANKS, J.; SPODNICK, G. Wound healing in veterinary rehabilitation patient. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.35, n.6, p.1453-1471, 2005.

HENDLUND, C. S. Surgery of the Intergumentary System. In: FOSSUM, T. W. **Small Animal Surgery**. 3º Ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. Cap.15, p.161-259.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.36, n.4, p.667-685, 2006.

HOU, M. et al. Topical apigenina improves epidermal permeability barrier homeostasis in normal murin skin by divergent mechanisms. **Exp Dermatol.**, v.22, p.210-215, 2013.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: Cicatrização Fisiológica. **Rev. Med. São Paulo**, v.89, n.3, p.125-31, 2010.

JAIN, R. H. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature Medicine**, v.9, n.6, p.685-693, 2003.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.20, n.1, p.1-25, 1990.

JÚNIOR, N. B. J. et al. Estudo da ação da romã (*Punica granatum L.*) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Rev. Bras. Plantas Med.**, Campinas, v.18, n.2, p.423-432, 2016.

KRAHWINKEL, D. J.; BOOTHE, H. W. Tropical and systemic medications for wounds. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.36, n.4, p.739-757, 2006.

LEITE, N. S. et al. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.17, n.1, p.164-170, 2015.

LI, K. et al. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complement Altern Med.**, v. 11, n. 1, p. 86, 2011.

LIEKENS, S.; DE CLERCK, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem Pharmacol.**, v.61, n.3, p.253-270, 2001.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.16, n.4, p.197-201, 2006.

LODHI, S.; SINGHAI, A. K. Wound healing effects of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. On streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.6, n.4, p.253-259, 2013.

MACHADO, H. et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v.27, n.1, p.33-39, 2008.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAJTAN, J. et al. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. **Archives of dermatological research**, v.305, n.7, p.619-27, 2013.

MAJEWSKA, I.; GENDASZEWSKA-DARMACH, E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing - a new face of old phytomedicines. **Acta Biochim Pol.**, v. 58, n. 4, p. 449-60, 2011.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **An Bras Dermatol.**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MANGA, H. M. et al. In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach, & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.209-214. 2004.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **Inter. J. of Food Microb.**, v.67, n.3, p.187-195, 2001.

MARQUES, I. C. S. **Óleo de semente de maracujá no reparo de feridas cutâneas em equinos e ratos Wistar.** (Tese) Doutorado em Cirurgia Veterinária. UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; Jaboticabal, 2016. 77p.

MARQUES, S. R. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cir Bras.**, v.19, n.3, p.196-209, 2004.

MARTINS, N. L. P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU). Estudo controlado em ratos. **Acta Cir Bras.**, v.21, n.3, p.66-75, 2006.

MASI, E. C. D. J. **A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.** (Tese) Doutorado em Clínica Cirúrgica. Universidade Federal do Paraná; Curitiba, 2015. 104p.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **J Surg CI Res.**, v.7, n.2, p.87-102, 2016.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3º Ed. Porto Alegre: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2001. Cap. 24, p.517-543.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.16, n.3, p.693-699.

NASCIMENTO, A. M. A. et al. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.92, n.1, p.95-100, 2007.

NETO, J. M. R. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de *Genipa americana L.* e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** [Tese] Doutorado em Biotecnologia. Universidade Tiradentes; Aracaju, 2011. 75p.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr.**, v.74, n.4, p.418-425, 2001.

NUNES, D. C. S. et al. Evaluation of cellular profile and main constituents the rat and mouse blood from the animal house of the Federal University of Ceará, Brazil. **Revista Medicina UFC**, v.34, n.1, p.21-29, 2004.

NUNES, F. I. A. **Caraterização estrutural de novos triterpenóides pentacíclicos.** {Dissertação} Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, Universidade de Coimbra. Portugal; Coimbra, 2013. 180p.

OLIVEIRA, F. P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.16, n.7, p.510-516, 2006.

OLIVEIRA, J. E. Z. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no centro de São João Del-Rei, MG. In: **Anais do X Seminário Mineiro de Plantas Mediciniais**, São João Del-Rei/UFSJ. p. 113-114, 2004.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da FZVA**, v.7, n.1, p.6474, 2000.

ORFILA, A. B.; CASANOVAS, R. V. Evidencias para el empleo del aceite de rosa mosqueta em heridas y cicatrices cutâneas. **Rev. Fitot.**, v.17, n.2, p.133-143, 2017.

OZAY, Y. et al. Evaluation of the wound healing properties of luteolin ointments on excision and incision wound models in diabetic and non-diabetics rats. **Rec. Nat. Prod.**, v.12, n.4, p.350-366, 2018.

PARENTE, L. M. L. **Atividades angiogênica, antiinflamatória, cicatrizante e antibacteriana do extrato etanólico e frações das flores da *Calendula officinalis* L. cultivadas no Brasil.** {Tese} Doutorado em Ciências Agrárias. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008. 72p.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery.** 3º Ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

PEERSCHKE, E. I.; YIN, W.; GHEBREHIWET, B. Platelet mediated complete activation. **Adv. Exper. Med. Biol.**, v.632, n.1, p.81-91, 2008.

PÉREZ, J. F. M. **Sistema de manejo para a candeia (*Eremanthus erythropappus*) (D. C.) MacLeish.** {Dissertação} Mestrado em Manejo Ambiental. Universidade Federal de Lavras. 2001. 71p.

PETERLE, J. P. **Estudo da atividade cicatrizante de hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado.** {Dissertação} Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2017. 159p.

PINHO, M. S. L. Imunoistoquímica: O estudo da biologia molecular ao alcance de todos. **Rev. Bras. Coloproct.**, v.25, n.2, p.188-191, 2005.

PIRIZ, M. A. et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.16, n.3, p.628-636, 2014.

PONNUSAMY, Y. et al. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. **J Ethnopharmacol.**, v. 168, p. 305-14, 2015.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v.63, n.18, p.569–575, 2003.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. (Dissertação) Mestrado em Biologia Geral e Aplicada. Instituto de Biociências, UNESP; Botucatu, 2012. 112p.

RAJA, K. S.; GARCIA, M. S.; ISSEROFF, R. R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Frontiers in Bioscience**, v,12, p.2849-68, 2008.

RIBEIRO S. R. et al. Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (*Solanaceae*). **Arquivos de Ciência e Saúde Unipar**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2007.

ROCHA, A. C. A. A.; CARNEIRO, F. A. S.; SOUZA, M. S. Tratamento domiciliar de feridas crônicas: relato de experiência da extensão na prática do cuidar. **Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina**, n.2, p.20-30, 2014.

SALA, A. et al. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **Journal of Ethnopharmacology**, v.461, p.53-61, 2003.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v.42, n.2, p.321-324, 2007.

SANTANA, L. P. G. **Avaliação do reparo tecidual durante o tratamento tópico com solução de papaína em feridas de camundongos black**. (Dissertação) Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2015. 65p.

SANTOS, J. B. **Avaliação e tratamento de feridas: orientações ao profissional de saúde**. 1º Ed. Porto alegre: Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 2011. 44p.

SANTOS, I. F. C. et al. Mel e açúcar mascavo na cicatrização de feridas. **Ciênc. Rural**, v.42, n.12, p.2219-24, 2012.

SARANDY, M. M. et al. Ointment of Brassica oleracea var. capitata matures the extracellular matrix in skin wounds of Wistar Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2015, p.1-9, 2015.

SARTO, M. P. M.; JÚNIOR, G. Z. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ**, v.20, n.1, p.98-102, 2014.

SCHUGART, R. C. et al. Wound angiogenesis as a function of tissue oxygen tension: A mathematical model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, n.7, p.2628-33, 2008.

SCOLFORO, J. R.; LOEUILLE, B.; ALTOÉ, T. Caracterização da Candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. editores. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: UFLA; 2012. p. 19-27.

SCOLFORO; J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: UFLA; 2012.

SHUKLA, R. et al. Fabrication of apigenin loaded gellan gum-chitosan hydrogels (GGCH-HGs) for effective diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.91, p.1110-11190, 2016.

SILVA, A. F. et al. Composição química do óleo essencial de Hyptis suaveolens (L.) Poit. (Lamiaceae). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.6, n.2, p.1-7, 2003.

SILVA, C. S. J. et al. Viabilidade econômica e rotação florestal de plantios de candeia (*Eremanthus erythropappus*), em condições de risco. **Cerne, Lavras**, v.20, n.1, p.113-122, 2014.

SILVA, E. M. F. et al. Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.36, n.2, p.277-283, 2015.

SILVA, F. A.; BIZERRA, A. M. C.; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa Orellana* L (Urucum). **HOLOS**, v.2, n.34, p.484-498, 2018.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p.530-9, 2012.

SILVÉRIO, M. S. **Estudo químico e farmacológico de *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz Bip. (Asteraceae).** {Dissertação} Mestrado em Farmacologia e Terapêutica Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004. 94p.

SILVÉRIO, M. S. et al. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythopappus* (DC) McLeish (Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, v.18, n.5, p.430-435, 2008.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **N Engl J Med.**, v.341, n.10, p.738-746, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** 1º Ed. Artmed; Porto Alegre, 2016. 502p.

SIQUI, A. C. et al. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, n.9, p.38-43, 2000.

SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais.** 3º Ed. v.1, São Paulo: Manole, 2007. 2806p.

SOARES, T. V.; FABRI, R. L. Composição química e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico das folhas de *Eremanthus erythopappus* (DC) Mcleish (Candeia). **Rev. Eletron. Farm.**, v.3, p.41-52, 2011.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC, 1991. 416p.

SOUSA, O. V. et al. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Ereanthus erythropappus* (DC) McLeisch. **Rev. Bras. Farm.**, v.89, n.2, p.113-116, 2008. (a)

SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. *J Pharm Pharmacol.*, v.60, n.6, p.771-777, 2008. (b)

SOUZA, M. M. S. **Ação de extratos vegetais no reparo de feridas cutâneas em ratos diabéticos**. (Tese) Doutorado em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa; 2016. 81p.

SOUZA, O. V. et al. Estudo farmacognóstico dos galhos de *Vanillosmopsis erythropappa*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.13, n,1, p.50-53, 2003.

SUNTAR, I. et al. Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, n.1, p.103-110, 2013.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch Pathol Lab Med.**, v.78, p.69-72, 1964.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cad. Esc. de Saúde**, Curitiba, v.1, n.15, p.7-17, 2015.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: A

Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.7, n.3, p.1089-1099, 2008.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORLYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina Ribeirão Preto**, Simpósio, v.41, n.3, p.259-64, 2008.

TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S.O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **An Bras Dermatol**, v.82, n.2, p.141-149, 2007.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.3, n.5, p.349-63, 2002.

TRINDADE, L. C. T. et al. Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.37, n.5, p.358-363, 2010.

TSALA, D. E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAM, S. Natural wound healing and bioactive natural products. **Phytopharmacology**, v.4, n.3, p. 532-60, 2013.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v.10, p.189-195, 2003.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.29, n.1, p.65-74, 2008.

VIEIRA, G. T. **Avaliação do efeito cicatrizante de Inga subnuda e Pseudopiptadenia contorta em feridas cirúrgicas em coelhos.** (Tese) Doutorado em Bioquímica Aplicada. Universidade Federal de Viçosa; Viçosa, 2015. 142p.

VITAL, C. E. et al. Flavonoid profiling by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). **Protocols.io Versão 2, 2018**. Disponível em: < <https://www.protocols.io/view/flavonoid-profiling-by-liquid-chromatography-coupl-zqgf3tw>> Acesso em 06 de Maio de 2019.

WU, X. B. et al. The effects of Polygonum cuspidatum extract on wound healing in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.141, n.3, p.934-37, 2012.

ZHANG, K. et al. Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activation the ERR α /PGC-1 α pathway. **Cardiovas Res.**, v.89, n.2, p.426-435, 2011.

ZHANG, Y. et al. Apigenin induces dermal collagen synthesis via smad2/3 signaling pathway. **Eur. J. Histochem.**, v.59, n.2, p.98-106, 2015.

ANEXO

ANEXO I – Certificado de submissão do trabalho à Comissão de Ética no Uso de Animais – UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 52/2018, intitulado **“Efeito do gel transdérmico obtido a partir dos extratos das folhas de *Vanillosmopsis erythropappa schultz* – búp na cicatrização de feridas cutâneas em estudo morfológico e molecular”**, coordenado pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 28/09/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 52/2018, named **“Effect of transdermal gel obtained from extracts of leaves of *Vanillosmopsis erythropappa schultz* - búp on the healing of cutaneous wounds in a morphological and molecular study”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on September 28, 2018 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV